PATENT COOPERATION TREA . .

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

SAHEKI, Kenji
10-9, Shiba 2-chome
Minato-ku
Tokyo 105-0014
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 10 March 1999 (10.03.99)	
Applicant's or agent's file reference PCT-83	**IMPORTANT NOTIFICATION**
International application No. PCT/JP98/04064	**International filing date** (day/month/year) 10 September 1998 (10.09.98)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☐ the inventor ☒ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
SAHEKI, Kenji 903, Mita-haitsu 5-12, Shiba 4-chome Minato-ku Tokyo 108-0014 Japan	Telephone No. Facsimile No. Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
SAHEKI, Kenji 10-9, Shiba 2-chome Minato-ku Tokyo 105-0014 Japan	Telephone No. Facsimile No. Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☒ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☒ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO **34, chemin des Colombettes** **1211 Geneva 20, Switzerland** Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Y. KUWAHARA Telephone No.: (41-22) 338.83.38

EO/US
PCT/JP98/04064

PATENT COOPERATION TREA .

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

United States Patent and Trademark Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 18 March 1999 (18.03.99)	
International application No.: PCT/JP98/04064	Applicant's or agent's file reference: PCT-83
International filing date: 10 September 1998 (10.09.98)	Priority date: 11 September 1997 (11.09.97)
Applicant: HORIKOSHI, Mamoru et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

[X] in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

10 September 1998 (10.09.98)

[ ] in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

______

2. The election [X] was

[ ] was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Translation

5T 09/508418

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCT-83	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP98/04064	International filing date (*day/month/year*) 10 September 1998 (10.09.98)	Priority date (*day/month/year*) 11 September 1997 (11.09.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/53, 9/02, 1/21, A01H 5/00 // (C12N1/21, 1:19)		
Applicant NIHON NOHYAKU CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

   ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

   These annexes consist of a total of ______ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

   I ☒ Basis of the report

   II ☐ Priority

   III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

   IV ☐ Lack of unity of invention

   V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

   VI ☐ Certain documents cited

   VII ☐ Certain defects in the international application

   VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
10 September 1998 (10.09.98)	01 June 1999 (01.06.1999)
Name and mailing address of the IPEA/JP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT	International application No. PCT/JP98/04064

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- [x] the international application as originally filed
- [ ] the description:
  pages ______________________, as originally filed
  pages ______________________, filed with the demand
  pages ______________, filed with the letter of ______________
- [ ] the claims:
  pages ______________________, as originally filed
  pages ______________, as amended (together with any statement under Article 19
  pages ______________________, filed with the demand
  pages ______________, filed with the letter of ______________
- [ ] the drawings:
  pages ______________________, as originally filed
  pages ______________________, filed with the demand
  pages ______________, filed with the letter of ______________
- [ ] the sequence listing part of the description:
  pages ______________________, as originally filed
  pages ______________________, filed with the demand
  pages ______________, filed with the letter of ______________

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language ______________ which is:
- [ ] the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- [ ] the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- [ ] the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/ or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:
- [x] contained in the international application in written form.
- [ ] filed together with the international application in computer readable form.
- [ ] furnished subsequently to this Authority in written form.
- [ ] furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- [ ] The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- [x] The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. [ ] The amendments have resulted in the cancellation of:
   - [ ] the description, pages ______________
   - [ ] the claims, Nos. ______________
   - [ ] the drawings, sheets/fig ______________

5. [ ] This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* *Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).*

** *Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.*

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 98/04064

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-26	**YES**
	Claims		**NO**
Inventive step (IS)	Claims	1-26	**YES**
	Claims		**NO**
Industrial applicability (IA)	Claims	1-26	**YES**
	Claims		**NO**

2. Citations and explanations

The inventions disclosed in Claims 1-26 are not disclosed in any of the documents cited in the international search report or in other documents deemed relevant to the field in question, and are not obvious to a person skilled in the art.

特許協力条約

PCT

国際調査報告

(法８条、法施行規則第40、41条)
〔ＰＣＴ１８条、ＰＣＴ規則43、44〕

出願人又は代理人の書類記号　ＰＣＴ－８３	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(ＰＣＴ／ＩＳＡ／２２０)及び下記５を参照すること。	
国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ９８／０４０６４	国際出願日 (日.月.年)　１０．０９．９８	優先日 (日.月.年)　１１．０９．９７
出願人（氏名又は名称）日本農薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条（ＰＣＴ１８条）の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で　3　ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

１．国際調査報告の基礎
　ａ．言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
　　☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
　ｂ．この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
　　☒ この国際出願に含まれる書面による配列表
　　☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
　　☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
　　☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
　　☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
　　☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

２．☐ 請求の範囲の一部の調査ができない（第Ｉ欄参照）。

３．☐ 発明の単一性が欠如している（第II欄参照）。

４．発明の名称は　☒ 出願人が提出したものを承認する。
　　☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

５．要約は　☒ 出願人が提出したものを承認する。
　　☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条（ＰＣＴ規則38.2(b)）の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から１カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

６．要約書とともに公表される図は、
　第＿＿＿図とする。☐ 出願人が示したとおりである。　☒ なし
　　☐ 出願人は図を示さなかった。
　　☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/04064

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl⁶ C12N 15/53, C12N 9/02, C12N 1/21, A01H 5/00//(C12N 1/21, C12R 1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl⁶ C12N 15/53, C12N 9/02, C12N 1/21, A01H 5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 94, No. 16, (1997), Inna Lermontova et al. "Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase" p. 8895-8900	1－26
Y	Biochem. J., vol. 260, (1989), Michel Matringe at al. "Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target for diphenyl ether herbicides" p. 231-235	1－26

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 15. 12. 98	国際調査報告の発送日 22.12.98
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100－8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 4B 9359 光本 美奈子 電話番号 03－3581－1101 内線 3449

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JP98/04064

C（続き）． 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	The Journal of Biological Chemistry, vol. 270, No. 14, (1995), Koichi Nishimura et al. "Cloning of a Human cDNA for Protoporphyrinogen Oxidase by Complementation in Vivo of a hemG Mutant of Escherichia coli" p. 8076-8080	1－26
Y	Journal of General Microbiology, vol. 113, (1979), A. Sasarman, P. et al. "Mapping of a New hem Gene in Escherichia coli K12" p. 297-303	1－26
A	Gene, vol. 182, No. 1-2, (1996), Shin-ichiro Narita et al. "Molecular cloning and characterization of a cDNA that encodes protoporphyrinogen oxidase of Arabidopsis thaliana" p. 169-175	1－26
Y	WO, 95/34659, A（ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト） 21. 12月. 1995 (21. 12. 95) & JP, 10-502524, A	1－26

6

特許協力条約

REC'D 14 JUN 1999
WIPO PCT

PCT

国際予備審査報告

（法第１２条、法施行規則第56条）
〔ＰＣＴ３６条及びＰＣＴ規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号　ＰＣＴ－８３	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式ＰＣＴ／ＩＰＥＡ／４１６）を参照すること。	
国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ９８／０４０６４	国際出願日 （日.月.年）　１０．０９．９８	優先日 （日.月.年）　１１．０９．９７
国際特許分類（ＩＰＣ） Int.Cl^6 C12N 15/53, C12N 9/02, C12N 1/21, A01H 5/00// (C12N 1/21, C12R 1:19)		
出願人（氏名又は名称） 日本農薬株式会社		

１．国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（ＰＣＴ３６条）の規定に従い送付する。

２．この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で　3　ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
（ＰＣＴ規則70.16及びＰＣＴ実施細則第６０７号参照）
この附属書類は、全部で＿＿＿＿ページである。

３．この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

Ⅰ ☒ 国際予備審査報告の基礎

Ⅱ ☐ 優先権

Ⅲ ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

Ⅳ ☐ 発明の単一性の欠如

Ⅴ ☒ ＰＣＴ３５条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

Ⅵ ☐ ある種の引用文献

Ⅶ ☐ 国際出願の不備

Ⅷ ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 １０．０９．９８	国際予備審査報告を作成した日 ０１．０６．９９
名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＰＥＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　９１５２ 冨永　みどり　（印） 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

様式ＰＣＴ／ＩＰＥＡ／４０９（表紙）（１９９８年７月）

国際予備審査報告	国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ９８／０４０６４

Ｉ．　国際予備審査報告の基礎

１．　この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。（法第６条（ＰＣＴ１４条）の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。ＰＣＴ規則70.16,70.17）

[x] 出願時の国際出願書類

[ ] 明細書　第 ＿＿＿＿＿ ページ、　出願時に提出されたもの
明細書　第 ＿＿＿＿＿ ページ、　国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書　第 ＿＿＿＿＿ ページ、　＿＿＿＿＿ 付の書簡と共に提出されたもの

[ ] 請求の範囲　第 ＿＿＿＿＿ 項、　出願時に提出されたもの
請求の範囲　第 ＿＿＿＿＿ 項、　ＰＣＴ１９条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲　第 ＿＿＿＿＿ 項、　国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲　第 ＿＿＿＿＿ 項、　＿＿＿＿＿ 付の書簡と共に提出されたもの

[ ] 図面　第 ＿＿＿＿＿ ページ／図、　出願時に提出されたもの
図面　第 ＿＿＿＿＿ ページ／図、　国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面　第 ＿＿＿＿＿ ページ／図、　＿＿＿＿＿ 付の書簡と共に提出されたもの

[ ] 明細書の配列表の部分　第 ＿＿＿＿＿ ページ、　出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分　第 ＿＿＿＿＿ ページ、　国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分　第 ＿＿＿＿＿ ページ、　＿＿＿＿＿ 付の書簡と共に提出されたもの

２．　上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である ＿＿＿＿＿ 語である。

[ ] 国際調査のために提出されたＰＣＴ規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
[ ] ＰＣＴ規則48.3(b)にいう国際公開の言語
[ ] 国際予備審査のために提出されたＰＣＴ規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

３．　この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

[x] この国際出願に含まれる書面による配列表
[ ] この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
[ ] 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
[ ] 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
[ ] 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
[x] 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

４．　補正により、下記の書類が削除された。
[ ] 明細書　第 ＿＿＿＿＿ ページ
[ ] 請求の範囲　第 ＿＿＿＿＿ 項
[ ] 図面　図面の第 ＿＿＿＿＿ ページ／図

５．[ ] この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。（ＰＣＴ規則70.2(c)　この補正を含む差し替え用紙は上記１．における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。）

Ｖ．　新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第１２条（ＰＣＴ３５条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

１．　見解

新規性（Ｎ）	請求の範囲	１－２６	有
	請求の範囲		無
進歩性（ＩＳ）	請求の範囲	１－２６	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性（ＩＡ）	請求の範囲	１－２６	有
	請求の範囲		無

２．　文献及び説明（ＰＣＴ規則70.7）

請求の範囲１－２６に記載された発明は、国際調査報告に記載された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、当業者にとって自明なものでもない。

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 **C12N 15/53, 9/02, 1/21, A01H 5/00 // (C12N 1/21, C12R 1:19)**	**A1**	(11) 国際公開番号 **WO99/13087** (43) 国際公開日 1999年3月18日(18.03.99)

(21) 国際出願番号 PCT/JP98/04064

(22) 国際出願日 1998年9月10日(10.09.98)

(30) 優先権データ
特願平9/265084 1997年9月11日(11.09.97) JP

(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）
日本農薬株式会社
(NIHON NOHYAKU CO., LTD.)[JP/JP]
〒100-0027 東京都中央区日本橋一丁目2番5号 Tokyo, (JP)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）
堀越　守(HORIKOSHI, Mamoru)[JP/JP]
豆塚弘毅(MAMETSUKA, Koki)[JP/JP]
広岡　卓(HIROOKA, Takashi)[JP/JP]
〒586-0094 大阪府河内長野市小山田町345番地
日本農薬総合研究所内 Osaka, (JP)
(74) 代理人
弁理士　佐伯健児(SAHEKI, Kenji)
〒108-0014 東京都港区芝四丁目5番12号
三田ハイツ903号 Tokyo, (JP)

(81) 指定国　AU, CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類
国際調査報告書

(54)Title: **NOVEL PROTOPORPHYRINOGEN OXIDASE TOLERANT TO LIGHT-REQUIRING HERBICIDES**

(54)発明の名称　光要求型除草剤耐性新規プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ

(57) Abstract

A protoporphyrinogen oxidase tolerant to light-requiring herbicides and derivatives thereof, comprising a polypeptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 or mutated peptides derived therefrom by deletion, addition, substitution, etc. of one or more amino acids in the above amino acid sequence and having an activity substantially equivalent to that of the protoporphyrinogen oxidase. The acquisition of the novel protoporphyrinogen oxidase, which is highly tolerant to light-requiring herbicides and originates in plants, makes it possible to construct plants highly tolerant to light-requiring herbicides via the expression of this enzyme in host plants.

(57)要約

配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、又は該アミノ酸配列において1個または複数個のアミノ酸の欠失、付加あるいは置換等が認められるアミノ酸配列を有し且つ実質的にプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼと同等の酵素活性を有する変異ペプチドからなる光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、その誘導体。植物由来の新規且つ光要求型除草剤に高度に耐性なプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを得た結果、該酵素を宿主植物中で発現させることによって、光要求型除草剤に高度に耐性な植物を作出することが可能。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボズニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルギナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴー
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサオ
GR ギリシャ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国
KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シエラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴー
TJ タジキスタン
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダッド・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴィェトナム
YU ユーゴースラビア
ZW ジンバブエ

明細書

光要求型除草剤耐性新規プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ

技術分野

本発明は、植物、特にタバコ由来の、光要求型除草剤に耐性なプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、該タンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター並びに該ベクターによる形質転換体に関する。

背景技術

プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは全生物に普遍的に存在するテトラピロール合成系において、プロトポルフィリノーゲンIXをプロトポルフィリンIXに変換する酵素である。

本合成系により、微生物、動物においてはヘムが合成され、一方、植物ではヘムの他にクロロフィルが合成される。本酵素は光要求型除草剤の標的酵素と考えられているが、酵素の同定及び遺伝子の単離は最近まで全くなされていなかった。1993 年に大腸菌のhemGがプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子として初めて単離され(Sasarman, A. et al. (1993) Can. J. Microbiol. 39:1156-1161.)、1994 年には枯草菌のhemYがプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子として単離された(Dailey, T. A. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:813-815.)。真核生物では 1995 年にヒトのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子がクローニングされ(Nishimura, K. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:8076-8080.)、同年にはマウスのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子もクローニングされた(Taketani, S. et al. (1995) Eur. J. Biochem. 230:760-765.)。植物においてはシロイヌナズナ及びトウモロコシのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子がクローニングされた(WO 95/34659)。

また、シロイヌナズナ及びトウモロコシの光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子も、大腸菌を用いたスクリーニング系によって、既に得られている。

シロイヌナズナ及びトウモロコシ由来の光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子(WO 95/34659)は大腸菌を用いて選抜されており、このような遺伝子が植物細胞中で充分な活性を発揮しうるのか、又耐性の程度は充分であるのかは明らかではない。

発明の開示

光要求型除草剤耐性植物を遺伝子組換えで作出する場合、用いる遺伝子としては、高等植物由来の光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子が有力な候補となる。他の生物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、例えば大腸菌のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは他生物のものに比べて分子量が明らかに小さい等、構造的に大きく異なり、枯草菌のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは可溶性である点が膜結合性の他の生物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼとは大きく異なる。また動物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼはトランジットペプチドを持たないにもかかわらずミトコンドリアに輸送されるという特殊な性質を持つ。このような各種生物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの性質の違いから、光要求型除草剤耐性植物を遺伝子組換えで作出する場合、高等植物由来のものが望ましい。

一方、単細胞生物である Chlamydomonas 由来の抵抗性遺伝子(WO 97/04088)はプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子であるかどうかは不明であり、高等植物に耐性を付与できるかどうかは明らかではない。

望ましい遺伝子としては従って、植物細胞あるいは植物体を除草剤存在下で選抜し、該植物細胞あるいは植物体中の耐性型遺伝子が植物細胞中で充分な生物活性及び高度な光要求型除草剤耐性を保持していることを確認した後、該遺伝子を何らかの方法で単離したものと考えられる。

従って、本発明の課題は、高等植物由来の、光要求型除草剤に高度に耐性なプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、該酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター並びに該ベクターによる形質転換体を提供することにある。

本発明者は、前記課題を解決すべく、高等植物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼについて鋭意研究を行った結果、植物細胞あるいは植物体を除草剤存在下で選択し、該植物細胞あるいは植物体中の耐性型遺伝子が植物細胞中で充分な生物活性及び高度な光要求型除草剤耐性を有していることを確認した後、該遺伝子を特定の方法で単離するという手段を取った。具体的には前記課題を解決すべく、高等植物特にタバコのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼについて鋭意研究を行った結果、タバコ由来の、光要求型除草剤に耐性を示すプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの遺伝子のクローニング及び発現に成功した。本発明の遺伝子は新規であって、本遺伝子産物の光要求型除草剤に対する耐性度を、既に報告されているシロイヌナズナ由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの耐性度と比較したところ、両者の構造の高い類似性にもかかわらず、本遺伝子産物の耐性度が大いに勝っていることが明らかとなった。従って、前記課題は、本遺伝子を

用いることによって解決することができる。

本発明は、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列、該アミノ酸配列において1個または複数個のアミノ酸の欠失、付加あるいは置換等が認められ且つ実質的に同等の酵素活性を有する光要求型除草剤耐性を示す変異ペプチド、からなるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、その誘導体又は変異体を提供する。さらに、配列番号2に記載のアミノ酸配列において、トランジットペプチドが欠失し且つ実質的に同等の酵素活性を有する光要求型除草剤耐性を示すアミノ酸配列からなるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを提供する。

配列番号2で示されるアミノ酸配列からなる本発明のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは、実質的に同等の酵素活性及び光要求型除草剤に対する耐性を損なうことがないかぎり、前記のアミノ酸配列において1個または複数個のアミノ酸の欠如、付加あるいは置換等が認められる変異ペプチド、すなわち、自然界に発見される変異ペプチドまたは人為的に改変した変異ペプチドが含まれる。

本発明のポリペプチドは、葉緑体に存在する酵素と考えられている。一般に、葉緑体等の細胞内小器官に存在するタンパク質のほとんどは核のゲノムにコードされており、細胞質で翻訳された後、N末端に存在するトランジットペプチドと呼ばれる輸送シグナルの働きによって、これら細胞内小器官に輸送される。輸送された後、トランジットペプチドは切除され、成熟したタンパク質となる。従って、本発明のポリペプチドのN末端にもトランジットペプチドが存在すると考えられる。また、生物活性を発現する本質はトランジットペプチドを除いた部分（成熟タンパク質部分）にあり、トランジットペプチドは活性に関与しない。従って、本発明にはトランジットペプチドを欠失した成熟タンパク質部分を包含する。

またより詳しくは、本発明は配列番号3に記載の塩基配列、又は該塩基配列において1個若しくは複数個の塩基が付加、欠失若しくは置換されており且つ実質的にプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼと同等の酵素活性を有する光要求型除草剤耐性を示すプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を提供する。

また前記ポリペプチドをコードする本発明によるDNA配列には、目的のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードするcDNA、イントロン及びエクソンを含む染色体DNA、同染色体DNAのイントロンを除去してエクソンを連結したDNA、さらには合成DNA法によって人為的に作製したオリゴヌクレオチドを連結して得た合成DNA等が含まれる。合成DNA法を用いて合成DNAを調製する際には、遺伝子コードの縮重により、アミノ酸配列を変化させることなく遺伝子の塩基配列を変化

させることによって、目的の組み換えDNAを調製することができる。したがって本発明のDNAは、目的のポリペプチドをコードする遺伝子の縮重に基づく全ての塩基配列をも包含する。

さらに、本発明は、前記の遺伝子を含む組換えベクター、前記のベクターによる形質転換体をも提供する。

図面の簡単な説明

第1図は pBNtPX-1 の模式図

第2図は pCR-HC 及び pCR-RC の模式図

▼:pCR-RC における変異

(配列番号1の 717 番目の塩基がCからTに変異し、231 番目のアミノ酸がアラニンからバリンに変異)

第3図は pBAtPX-C及び pBAtPX-RC の模式図

▼:pBAtPX-RC における変異

(WO 95/34659 の pAraC-1Val と同一の変異)

第4図は pBI-NtPX-HC 及び pBI-NtPX-RC の模式図

▼:pBI-NtPX-RC における変異

(配列番号 1 の 717 番目の塩基がCからTに変異し、231 番目のアミノ酸がアラニンからバリンに変異)

第5図は pBI-AtPX-HC 及び pBI-AtPX-RC の模式図

▼:pBI-AtPX-RC における変異

(WO 95/34659 の pAraC-1Val と同一の変異)

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

植物細胞及び組織培養の一般的操作、あるいはmRNAの精製、cDNA、cDNAライブラリー、組換えDNAの作製、DNAの塩基配列の決定等の一連の分子生物学的な操作、あるいは植物の形質転換等の植物分子生物学的操作は、公知の実験書、それぞれ Plant Cell and Tissue Culture, Vasil, I. K. and Thorpe, T. A. Kluwer Academic Publishers, 1994 等、あるいは Molecular Cloning 2nd Edition, CSH Laboratory Press, Sambrook, J. et al., 1989、

Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Ausubel, M. et al.等、あるいはPlant Molecular Biology Manual, Gelvin, S. A. et al. Kluwer Academic Publishers, 1991, 1995(Second edition)等に従って実施することができる。

1. 光要求型除草剤

本発明で用いられる光要求型除草剤とは、除草活性発現のために光を必要とする除草剤であり、光要求型除草剤を植物に処理すると、まず、細胞中の膜系が過酸化的に破壊され、次いで、地上部が白化し、ついには枯死する。光要求型除草剤処理細胞ではプロトポルフィリン IX が蓄積することが見いだされ(Matringe, M. and Scalla, R. (1988) Plant Physiol. 86:619-622.)、その後の研究で、光要求型除草剤の標的酵素は、テトラピロール合成系においてプロトポルフィリノーゲンをプロトポルフィリン に変換するプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼであることが明らかとなった(Matringe, M. et al. (1989) Biochem, J. 260:231-235.)。現在では、光要求型除草剤の作用機作は以下のように考えられている。光要求型除草剤によって植物細胞中のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼが阻害されると、まず、基質のプロトポルフィリノーゲン IX が蓄積し、このプロトポルフィリノーゲン IX から、非酵素的に、あるいは細胞質中の光要求型除草剤非感受性の非特異的酸化酵素によってプロトポルフィリン IX が大量に生成される。このプロトポルフィリン IX が光存在下で光増感反応を引き起こし、大量の活性酸素が発生し、これが膜系を過酸化的に破壊し、植物を枯死に至らせる(Scalla, R. and Matringe, M. (1994) Rev. Weed Sci. 6:103-132.)。このような作用機作から、光要求型除草剤は、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(Protox)阻害剤、ポルフィリン蓄積型除草剤とも呼ばれている。

光要求型除草剤には多様な構造の化合物が属している。代表的なものとしては、ジフェニルエーテル系、オキサジアゾール系、ピリジン系、ピリミジン系、環状イミド系、トリアゾール系、ピラゾール系等がある(Scalla, R. and Matringe, M. (1994) Rev. Weed Sci. 6:103-132.)。

本発明の光要求型除草剤として望ましくは、トリアゾール系、ピラゾール系であり、最も望ましくは例えば、下記に示すピラゾール系化合物である。

化合物名

英名：ethyl 2-chloro-5-(4-chloro-5-difluoromethoxy-1-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-4-fluorophenoxyacetate

和名:2-クロロ-5-(4-クロロ-5-ジフルオロメトキシ-1-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-4-フルオロフェノキシ酢酸エチル(以下,化合物Aという。特開平 3-163063 に記載)

英 名 : ethyl 2-[5-(4-chloro-5-difluoromethoxy-1-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-2,4-dichloro-phenylamino] propionate

和名:2-[5-(4-クロロ-5-ジフルオロメトキシ-1-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-2,4-ジクロロ-フェニルアミノ] プロピオン酸エチル(以下,化合物Bと言う。特開平 3-163063 に記載)

英名:4-chloro-3-(4-chloro-2-fluoro-5-methoxyphenyl)-5-difluoromethoxy-1-methyl-1H-pyrazole

和名:4-クロロ-3-(4-クロロ-2-フルオロ-5-メトキシフェニル)-5-ジフルオロメトキシ-1-メチル-1H-ピラゾール(以下,化合物Cという。特開平 4-225937 に記載)

英名:4-chloro-3-[4-chloro-2-fluoro-5-(2-propynyl)oxyphenyl]-5- difluoromethoxy-1-methyl-1H-pyrazole

和名:4-クロロ-3-[4-クロロ-2-フルオロ-5-(2-プロピニル)オキシフェニル]-5- ジフルオロメトキシ-1-メチル-1H-ピラゾール(以下,化合物Dという。特開平 3-163063 に記載)

英名:ethyl 2-[2-chloro-5-(4-chloro-5-difluoromethoxy-1-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-4-fluorophenoxy] propionate

和名:2-[2-クロロ-5-(4-クロロ-5-ジフルオロメトキシ-1-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-4-フルオロフェノキシ]プロピオン酸エチル(以下,化合物Eという。特開平 3-163063 に記載)

英 名 : 1-methylethyl 5-[4-bromo-1-methyl-5-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2-chloro-4-fluorobenzoate

和名:5-[4-ブロモ-1-メチル-5-(トリフルオロメチル)-1H-ピラゾール-3-イル]-2-クロロ-4-フルオロ-安息香酸 1-メチルエチル(以下,化合物Fという。特表平 10-502926 に記載)

英名:4-chloro-3-(4-chloro-2-fluorophenyl)-5-difluoromethoxy-1-methyl-1H-pyrazole

和名:4-クロロ-3-(4-クロロ-2-フルオロフェニル)-5-ジフルオロメトキシ-1-メチル-1H-ピラゾール(以下,化合物Gという。特開平 3-72460 に記載)

2. 光要求型除草剤耐性タバコカルスの選抜

植物は、一細胞であるプロトプラストから細胞塊であるカルスを経て、再度完全な植物体に分化することができ、植物の持つこのような性質は分化全能性(totipotency)と呼ばれている。また、植物の培養細胞の特徴として、それらの細胞が変異に非常に富んでいることが挙げられ、このような変異は体細胞変異(somaclonal variation)と呼ばれている。従って、このような培養細胞を何らか

の薬剤、例えば除草剤で選抜すれば、除草剤耐性細胞を得ることができ、さらに、得られた除草剤耐性細胞は、分化全能性を利用して植物体まで再生させることができる。このような例としては、グリホセート耐性植物(Singer, S. R. and Mcdaniel, C. N. (1985) Plant Physiol. 78:411-416)、スルフォニルウレア耐性植物(Chaleff, R. S. and Ray, T. B. (1984) Science 223:1148-1151.)など、多くの例が知られている。しかし、培養細胞は培養を続けているうちには何らかの原因で、分化全能性を失っていることが多く、又、このような方法では除草剤耐性を異種の植物に導入するのは困難である。そこで、除草剤耐性細胞から除草剤耐性遺伝子を単離できれば、得られた遺伝子を既知の方法、例えばアグロバクテリウム法等で、様々な有用作物に導入することができる。そのような除草剤耐性遺伝子には、除草剤自体を分解する遺伝子、例えばブロモキシニル分解遺伝子(Stalker, D. M. et al. (1988) Science 242:419-423.)、ビアラフォス分解遺伝子(De Block, M. et al. (1987) EMBO J. 6:2513-2518)、除草剤によって生成される何らかの毒性物質を分解する遺伝子、例えばスーパーオキサイドディスムターゼ遺伝子(Furusawa, I. et al. (1987) Plant Cell Physiol. 25:1247-1252.)、除草剤耐性型標的酵素遺伝子、例えばスルフォニルウレア耐性型アセト酪酸合成酵素(ALS)遺伝子(Lee, K. Y. et al. (1988) EMBO, J. 7:1241-1248.)、グリフォセート耐性型5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)遺伝子(Comai, L. et al. (1985) Nature 317:741-744)等が知られている。

3. 培養細胞における除草剤耐性機構

前述した、除草剤耐性培養細胞における耐性機構としては、解毒機構の獲得、細胞内への薬剤の透過性の変化、標的酵素の過剰生産及び標的酵素の除草剤耐性型への変異等が考えられる。耐性がいずれの機構によるかを解明することは、除草剤が阻害する反応の前駆体の蓄積の有無、同じあるいは異なった作用機構を示す様々な構造の除草剤に対する耐性の比較、耐性細胞及び感受性細胞から標的酵素を抽出し酵素活性を比較すること及び選抜に用いた除草剤に対する標的酵素の感受性を試験管内で検討すること等によって推定できる。その結果、有用な除草剤耐性遺伝子を保有していることが明らかとなれば、除草剤耐性遺伝子の単離のための有用な遺伝子源となる。

4. 遺伝子のクローニング法

遺伝子のクローニング法には、タンパク質の情報を利用する方法、核酸の情報を利用する方法及び遺伝学的方法がある。タンパク質の情報を利用する方法には、標的タンパク質を精製し、これに対する抗体を用いて発現型ライブラリーをスクリーニングする方法、標的タンパク質のアミノ酸配

列を部分的にでも解明し、その情報から核酸プローブあるいはPCR用プライマーを合成する方法等がある。しかし、一般的に、タンパク質を精製することは、比較的困難である。一方、核酸の情報を利用する方法は、生物間における遺伝子の相同性を利用して、他の生物の遺伝子をプローブとして用い、ハイブリダイゼーション等によって、目的とする遺伝子を釣り上げるという方法である。生物間における遺伝子の相同性は、用いた生物、用いた遺伝子によって異なり、ハイブリダイゼーションの条件は、様々な条件で試みた後、経験的に求められるものであり、又、場合によっては、最適条件が求められない場合もある。又、これらの方法では、得られた遺伝子の産物の生物活性を何らかの方法で確認する必要がある。

一方、遺伝学的方法とは、目的とする遺伝子が遺伝的に欠損した突然変異微生物株例えば大腸菌、枯草菌、酵母等に、異種生物由来の同一タンパク質遺伝子をその生物中で発現するような形で導入し、生育を相補させるという方法である。この方法は遺伝的相補法とも呼ばれ、遺伝子を単離した時点で、遺伝子の産物の生物活性は、既に、確認済みである。しかし、高等生物由来の遺伝子を、微生物で発現させた場合、翻訳後の修飾例えば糖鎖の付加等がなされずに酵素活性を発揮できない、ベクター由来のタンパク質あるいはトランジットペプチドがN端に付加されているため酵素活性を発揮できない、等が原因で、生育が相補されない可能性がある。それにもかかわらず、植物のテトラピロール合成系において Glu-tRNA から Glutamate-1-semialdehyde を合成する Glu-tRNA Reductase、Glutamate-1-semialdehyde から 5-Aminolevulinic acid を合成する Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase がそれぞれ、大腸菌の hemA 遺伝子欠損変異株、hemL 遺伝子欠損変異株を用いて遺伝的相補法によってクローニングされている(Ilag, L. L. et al., (1994) Plant Cell 6:265-275.)。従って、本発明においては植物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを遺伝的方法でクローニングする場合にも、大腸菌の遺伝子欠損変異株を利用することが有効であると考えられる。プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを欠失した大腸菌の変異株としては、hemG 遺伝子欠損変異株の SASX38 (Sasarman, A. et al. (1979) J. Gen. Microbiol. 113:297-303.)及び VSR751(Nishimura, K. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:8076-8080.)が知られている。

5. cDNAライブラリーの作製法

植物の全RNAは、RNA抽出法として知られている公知の方法、例えばグアニジン法、グアニジン・フェノール法、SDSフェノール法等を用い、植物体から抽出することができる。さらに、抽出された全RNAから常法、例えばオリゴdTセルロース法等によってmRNAを精製することができる。

cDNAの作製は、前記実験書の方法等、常法に従って行うことができる。精製されたmRNAを鋳型とし、Okayama-Berg法、Gubler-Hoffman法等によって二本鎖cDNAを合成することができる。

cDNAを、常法に従って、プラスミド、あるいは λファージ等に結合し、cDNAライブラリーを作製することができる。用いるベクターとしては、MCSの上流に lacZ、tac 等のプロモーターを持つもの(例えば pUC 系プラスミド、λgt11 系ファージ)を選択し、発現型cDNAライブラリーを作製することが望ましい。さらに、プライマーとしてプライマーアダプター等を用いることによって一方向性のライブラリーを作製することもできる。

6. プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼcDNAのクローニング及び解析

発現型cDNAライブラリーを大腸菌の hemG(プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子)欠損突然変異株中に導入し、生育を相補するcDNAクローンを単離することによってプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子をクローニングすることができる。クローニングした遺伝子はマキサム・ギルバート法や、サンガー法によって全塩基配列を解明することができる。さらに市販の塩基配列解析ソフトウェア、例えば Genetyx(SDC 社)、DNASIS(日立ソフトウェアエンジニアリング社)を用いてタンパク質をコードする部分の検索、既知の遺伝子との塩基配列の相同性等の解析を行うことができる。

7. 光要求型除草剤耐性カルスからの光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子のクローニング

プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの光要求型除草剤耐性型への変換に起因する光要求型除草剤耐性機構を有するタバコカルスからプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子をクローニングする場合、必ずしもcDNAライブラリーの構築及び遺伝的相補法を行う必要はなく、PCRによって比較的容易にクローニングすることができる。本発明で明らかにされたタバコの葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子の塩基配列情報から、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードするオープンリーディングフレーム全体を増幅しうるPCRプライマーをデザインし、これらを用いてRT－PCR(mRNAを逆転写酵素によってcDNAに変換し、これをPCRにかける)を行えば、比較的容易に生物活性を持ったプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子のクローニング及びプラスミドベクターへのサブクローニングを行うことができる。光要求型除草剤耐性カルスから得られた各遺伝子の光要求型除草剤に対する耐性の程度は、得られたプラスミドを大腸菌の hemG 欠損変異株に導入し、得られた大腸菌の生育に対する光要求型除草剤の阻害の程度を比較することによって、比較的容易に検討することができる。

8. 光要求型除草剤耐性植物の作出

本発明で示された光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を用いれば、光要求型除草剤耐性植物を作出することができる。すなわち、植物細胞中で機能するプロモーター、光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子、植物細胞中で機能するターミネーターからなる発現カセットを適当なプラスミドベクターに組み込み、公知の遺伝子導入法、例えば、アグロバクテリウム法、プロトプラストへのエレクトロポレーション法、植物組織へのパーティクルガン法等を用い、発現カセットを植物細胞中に導入し、形質転換植物を作出することができる。得られた植物は光要求型除草剤耐性という農業上有用な形質を持つ。又、異なった遺伝子を持つ発現カセットも同時に利用すれば、本遺伝子によって発現される光要求型除草剤耐性という性質を、形質転換植物の選択マーカーとして利用することもできる。

適当なプラスミドベクターとしてはアグロバクテリウム法を用いる場合には、pBI 系プラスミドあるいは pMON 系プラスミド等を挙げることができ、その他の方法を用いる場合には pUC 系プラスミド、pBluescript 系プラスミド等を挙げることができる。又、植物で機能するプロモーターとしては、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35Sプロモーター等、植物で機能するターミネーターとしてはCaMVターミネーター等が挙げられる。これらに関しては、前述の実験書、例えば Plant Molecular Biology Manual, Gelvin, S. A. et al. Kluwer Academic Publishers, 1991, 1995(Second edition)等に、詳細な説明が記載されている。

実施例

以下に実施例を示して本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は、これらに限定されるものではない。

<u>実施例1. 光要求型除草剤耐性タバコカルスの選抜</u>

A. タバコプロトプラストの調製、カルスの再生及び光要求型除草剤に対する感受性の検討

温室内で全高 40cm 程に生育させたタバコ(Nicotiana tabacum var. Xanthi NC)の葉を切り取り、メスで 5cm 画の大きさに切った後、70%エタノールに 30 秒間、次亜塩素酸ナトリウム水溶液(有効塩素濃度 1%)に 15 分間浸漬し、表面殺菌した。滅菌水で 3 回洗浄した後、上皮細胞を除去し、酵素液(1% cellulase onozuka R-10 及び 0.05% macerozyme R-10(ヤクルト社)を含む 0.6M マンニトール(pH 5.8))に 26℃で 3 時間浮遊させた。酵素処理後、Murasige-Skoog(MS)培地で 3 回遠心洗浄し、得られたプロトプラストを 1ppm の NAA 及び BA を添加した 0.6%寒天を含む MS 固体培地に

細胞数が 10^8/ml となるように包埋し、シャーレに 1mm の厚さにまいた。暗黒下、27℃で培養し、プロトプラストからカルスを再生させた。培養 4 週間後、1mm 程になるまで生育したカルスを含む寒天培地を 1cm 幅の短冊状に切り、様々な濃度の化合物H(化合物名:4-クロロ-3-[2,4-ジクロロ-5-(2-プロペニルオキシ)フェニル]-5-ジフルオロメトキシ-1-メチル-1H-ピラゾール, 英文名: 4-chloro-3-[2,4-dichloro-5-(2-propenyloxy)phenyl]-5-difluoromethoxy-1-methyl-1H-pyrazole、特開平 3-163063 に記載)を添加したMS固体培地上にのせ、タバコカルスの光要求型除草剤に対する感受性を検討した。その結果、表1に示すように、10nM で完全に枯死することが明らかとなった。

表1 化合物Hに対するタバコカルスの感受性

濃度(nM)	生存率(%)
0	100
2.5	30
5	10
10	0
20	0
40	0
80	0

B. 光要求型除草剤に対して高度な耐性を示すカルスの選抜

タバコカルスが完全に枯死する濃度の2倍の濃度(20nM)の化合物Hを含む培地を用い、光要求型除草剤耐性カルスの選抜を開始した。供試した $1x10^{10}$ のプロトプラストからの再生過程で $1x10^5$ の耐性カルスが得られた(表2)。得られた耐性カルスを順次化合物Hの濃度を上げた培地に移植し、最終的に 2,400nM の濃度でも生育可能な 36 株が得られ、特に生育が旺盛な 3 株(ETR-056、ETR-245 及び ETR-253 株)を選抜した。

表2 光要求型除草剤耐性株の選抜過程

濃度(nM)	耐性株数
20	100,000
30	50,000
50	40,000
75	7,200
150	254
300	120
600	66
1,200	46
2,400	36
5,000	0

供試プロトプラスト数:$1X10^{10}$

実施例2. 光要求型除草剤耐性カルスにおける耐性機構の解析

A. 光要求型除草剤耐性株におけるプロトポルフィリン IX の蓄積

選抜した3株の光要求型除草剤に対する耐性機構を解析することを試みた。光要求型除草剤処理植物体中では、プロトポルフィリン IX の蓄積が報告されているため、光要求型除草剤処理した耐性カルスにおけるプロトポルフィリン IX の蓄積を経時的に、測定することを試みた。化合物H 1,200nM を含む MS 液体培地で明条件下で継代培養している耐性カルスを化合物Hを含まない MS 液体培地で 24 時間暗条件下で培養した後、化合物H 1,200nM を含む MS 液体培地に移植し、暗条件下で6、12、18、24、32及び48時間培養後にカルスを採取し、プロトポルフィリン IX 量を測定した。カルスからのプロトポルフィリン IXの抽出及び定量は、以下の様に行った(Matringe, M. et al. (1989) Biochem, J. 260:231-235.)。カルス 500mg(生重)を乳鉢で破砕し、アセトン:1N NH_4OH (9:1)7.5ml で抽出した。抽出液を 3,000xg、10 分間遠心分離し、上清を採取した。得られた上清にヘキサンを2.5ml加え、充分に振とうした後、下層を回収した。さらに2回ヘキサンで洗浄した後、得られた下層中のプロトポルフィリン IX の量を、蛍光分光光度計で Ex 405nm-Em 631.5nm の値から測定した。なお、抽出操作は全て安全光下で行った。

その結果、プロトポルフィリン IX 量は、感受性株では 24 時間後で 1.3μg/g 生重、48 時間後で

1.9μg/g 生重、ETR-056 株では 24 時間後で 1.7μg/g 生重、48 時間後で 4.6μg/g 生重であり、時間の経過と共にプロトポルフィリン IX の蓄積が認められた。一方、ETR-245 及び ETR-253 株ではプロトポルフィリン IX の蓄積はほとんど認められなかった。

B. 光要求型除草剤耐性株の各種除草剤に対する耐性

さらに、様々な作用点を有する薬剤に対する各耐性株の耐性を検討した。光要求型除草剤でプロトポルフィリン IX を蓄積させるフォメサフェン(商品名フレックス)及びオキサジアゾン(商品名ロンスター)、クロロフィル合成阻害剤でブリーチングを引き起こすピラゾキシフェン(商品名パイサー)、アミノ酸合成阻害剤である DPX-84、ビアラフォス(商品名バスタ)、グリホセート(商品名ラウンドアップ)、タンパク質合成阻害剤であるブタクロール(商品名マーシェット)、光合成光化学系Iの阻害剤であるプロパニル(商品名スタム)、光合成光化学系IIの阻害剤で活性酸素を生成させるパラコート(商品名プリグロックス)に対する感受性を比較した。各薬剤を含む MS 液体培地に各耐性株を移植し、最小阻害濃度(MIC)を測定した。その結果(表3)、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ阻害剤でプロトポルフィリン IX を蓄積させるフォメサフェン、オキサジアゾンに対し、いずれの耐性株も強い抵抗性を示した。また、ETR-056 株は、パラコートに対し、ETR-253 株はピラゾキシフェン、DPX-84 及びグリホセートに対しても抵抗性を示した。以上の結果から、ETR-056 株はスーパーオキサイドディスムターゼの過剰生産等による活性酸素に対する耐性、ETR-253 株は膜の透過性の低下による多剤耐性、ETR-245 株は標的酵素の変異あるいは標的酵素の過剰生産による耐性と考えられた。

表3 各種除草剤に対する光要求型除草剤耐性株の感受性

	MIC(ppm)			
薬剤	感受性株	ETR-056 株	ETR-245 株	ETR-253 株
フォメサフェン	0.4	4	4	4
オキサジアゾン	1	1000	1000	1000
ブタクロール	100	100	100	100
ピラゾキシフェン	100	100	100	200
プロパニル	100	100	100	100
ビアラフォス	10	1	1	10
DPX-84	0.01	0.01	0.01	0.1

グリホセート	230	230	230	1000
パラコート	10	100	10	10

C. 光要求型除草剤耐性株の他の ET 系除草剤に対する感受性

感受性株及び ETR-056、ETR-245 及び ETR-253 株に対する化合物Aの MIC を測定した。その結果、感受性株に対する MIC は 5nM であったが、いずれの耐性株に対する MIC も 2,400nM 以上であり、いずれの耐性株も化合物Aに対して強い耐性を示すことが明らかとなった。そこで、以下の実施例では光要求型除草剤として化合物Aを、耐性株として ETR-245 株を用いた。

D. 感受性及び ETR-245 株からのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ粗酵素液の抽出

Nicolaus, B. et al. (1993) in "Target Assays for Modern Herbicide and Related Phytotoxic Compound" Lewis Publishers, pp. 35-41. に従って、MS 固体培地で 1 カ月間培養したカルスに 5 倍量の抽出バッファー(50mM Tris-HCl(pH 7.5)、0.5M sucrose、0.2% BSA、1mM EDTA)を加え、ジューサーで破砕した。ガーゼで濾過した後、10,000xg、5 分間、4℃で遠心分離した。得られた沈殿を再度 25ml の抽出バッファーに懸濁し、150xg、2 分間、4℃で遠心分離した。得られた上清を 4,000xg、15 分間、4℃遠心分離し、沈殿を 2ml の 20% グリセリンに溶解した。得られた粗酵素液のタンパク質量をタンパク質測定キット(Bio−Rad社)で測定した。

E. プロトポルフィリノーゲン IX の調製

13g の水銀及び 0.5g の薄層金属ナトリウムを 500ml 容の丸底フラスコに入れ、窒素ガスで 5 分間平衡化した後、約 5 分間振とうすることによって、ナトリウムアマルガムのパウダーを作製した。

8.4mg のプロトポルフィリン IX を 15ml の 20% エタノールを含む 10mM KOH に溶解し、4℃で保存した。プロトポルフィリン IX の保存液 4ml に等量の反応液(0.1M MES、50mM アスコルビン酸)を加え、調製直後の 16mg のナトリウムアマルガムを添加し、窒素ガス下、暗所で激しく振とうした。この反応液を暗所で 3 重のグラスフィルターで濾過し、0.1M MES(pH4.5)で 2.5 倍に希釈し、200 μM プロトポルフィリノーゲン IX として 1ml ずつ遮光した試験管に分注し、-80℃で保存した。

F. プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性の測定

反応バッファー(100mM Tris-HCl(pH 7.6)、1mM EDTA、5mM DTT、0.03% Tween80)3ml を蛍光分光光度計のセルに分注後、粗酵素液を終濃度が 0.1mg タンパク質/ml になるように添加し、室温までゆっくり加熱した。加熱後、プロトポルフィリノーゲン IX を終濃度が 2 μM となるように添加し、窒素

ガスで気相を置換して反応を開始した。反応 10 分後からの 30 分間の蛍光を蛍光分光光度計でモニターし、酵素活性を測定した(Ex:405nm、Em:631.5nm)。

G. ETR-245 株から抽出したプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼに対する化合物Aの阻害活性

感受性タバコカルス及びETR-245 株から抽出した粗酵素液におけるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性及び及び化合物Aによる阻害の程度を比較した(表4)。その結果、感受性株由来の粗酵素液の活性は 2.39unit、ETR-245 株由来の粗酵素の活性は 2.85unit であり、両者の活性に大きな違いは認められなかった。一方、感受性株由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性に対する化合物Aの 50%阻害濃度(IC_{50})は 48nM であるのに対し、ETR-245 株由来の酵素活性に対する化合物Aの IC_{50} は 5,000nM 以上であり、酵素レベルでは 100 倍以上の耐性を示した。なお、5,000nM 以上では反応液が白濁し、蛍光の測定が不可能であった。以上の結果から、ETR-245 株における光要求型除草剤耐性の作用機作は、光要求型除草剤の標的酵素であるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの過剰生産に起因するのではなく、酵素の構造に何らかの変異が生じたことに起因すると考えられた。

表4 感受性株及び ETR-245 株のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性に及ぼす化合物Aの影響

	酵素活性(unit)	
化合物A濃度(nM)	感受性株	ETR-245 株
0	2.39	2.85
10	4.32	3.59
20	3.62	−
40	1.84	4.41
100	0.00	2.21
500	0.00	3.49
1,000	0.00	2.85
2,400	0.00	2.48
5,000	0.00	1.56

IC_{50}値(nM)	48	>5000

1unit=1nMプロトポルフィリノーゲンIX/min/mgタンパク質

実施例3. タバコプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼcDNAのクローニング

A. mRNAの調製

タバコ(Nicotiana tabacum var. SR1)の緑葉を9g切り取り、液体窒素中で磨砕した。磨砕した緑葉に40mlのRNA抽出用緩衝液(200mM Tris-HCl (pH9.0), 100mM NaCl, 10mM EDTA, 0.5% SDS, 0.1% 2-ME)及び40mlのトリス飽和フェノールを加え、10分間激しく振とう後、2,000xg、10分間遠心分離して上清を回収した。この上清にトリス飽和フェノールを等量加え、10分間の振とう及び10分間の遠心分離を繰り返した。得られた上清に、等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)を加え、10分間の振とう、5分間の遠心分離を2回行った。得られた上清に等量のクロロホルム:イソアミルアルコール(24:1)を加え10分間の振とう、3分間の遠心分離を2回行った。得られた上清に10分の1量の3M酢酸ナトリウム(pH5.2)及び2.5倍量のエタノールを加え、-80℃に30分間静置した。静置後、2,000xg・20分間・4℃で遠心分離し、得られた沈殿を70%エタノールで洗浄した。乾燥した沈殿に蒸留水を加え1mg/mlに希釈し、終濃度が2Mとなるように10M塩化リチウムを加え、氷上で2時間静置した。静置後、2,000xg・30分間・4℃の遠心分離によって沈殿を回収し、全RNA画分を得た。

全RNA画分からのmRNAの精製はオリゴdTスパンカラム(ファルマシア社製)を用い、付属の説明書に従って行った。

B. cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーの作製はSuperscript Lamda System(GIBCO BRL社)を用いた。このキットは第1鎖合成時にプライマーアダプターを用い、得られたcDNAをλgt22AのlacZプロモーターに対して正方向にそう入することが可能である。

上記の方法で得た4μgのmRNAを鋳型とし、キット添付の説明書に従ってcDNA第1鎖合成、cDNA第2鎖合成、アダプターの結合、制限酵素処理及びカラムクロマトグラフィーを行った。得られたcDNAをλgt22Aアームと結合させた後、Gigapack Gold(ストラタジーン社)を用い、添付の説明書に従ってファージ粒子を再構成させた。約190万の独立クローンを含むプライマリーライブラリ

ーを大腸菌 Y1090(r-)株に感染、増殖させ、増幅ライブラリーとして保存した。

C. 遺伝的相補法

大腸菌の hemG(プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ)遺伝子欠損変異株である SASX38 株を用い、Nishimura らの方法(Nishimura, K. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:8076-8080.)に従って、遺伝的相補法を行った。10mM $MgSO_4$ 及び 0.2% マルトースを含むLB液体培地中で前培養した SASX38 株に上記の増幅cDNAライブラリーを感染させ、遺伝子発現を誘導した後、LB固体培地上にまいた。37℃で 2 日間培養後、多数の小さなコロニー中にいくつかの生育の回復した大きなコロニーが認められた。大きなコロニーをLB液体培地中で一晩培養後、4%になるようにクロロホルムを加え、よく攪拌し、30 分間以上室温に放置後、遠心分離し、上清としてファージ粒子を得た。得られたファージ粒子を、再び大腸菌 Y1090(r-)株に感染させ、単一プラークを 4%クロロホルムを含むSM培地に懸濁した。回収した組換えファージ粒子は、SASX38 株に再感染させ、生育回復能を示すものだけを再選抜した。以上のような方法によって、これら組換えファージベクターによる、大腸菌におけるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性の発現が確認された。

D. cDNAインサートの分析

cDNAインサートの増幅はPCRによって行った。すなわち、回収した組換えファージ粒子に含まれるDNAを鋳型とし、Taq DNA polymerase(TAKARA EX Taq、宝酒造社)、λgt22A 用フォワードプライマー(5'-ATT GGT GGC GAC GAC TCC TGG AG-3'、配列番号4)及びリバースプライマー(5'-CCA GAC CAA CTG GTA ATG GTA GCG-3'、配列番号5)を用いて、94℃で 1.5 分間、69℃で 1.5 分間、72℃で 2 分間の反応からなる 1 サイクルを、30 サイクル行った。反応産物の一部をアガロースゲル電気泳動によって分析したところ、いずれのサンプルにも 2.0kbp 前後のcDNAが増幅されていることが明らかとなった。増幅されたcDNAをクロロホルム処理およびエタノール沈殿によって回収した後、制限酵素切断解析によって比較したところ、いずれのcDNAにも EcoRV 部位が認められた。

E. cDNAインサートのサブクローニング及び生物活性の確認

PCRによって増幅されたcDNAインサート中で最大のものを、pBluescript SK(-)(ストラタジーン社)の EcoRV 部位に、前述の実験書(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Jhon Wiley & Sons, Ausubel, M. et al.)に記載のTAクローニング法によって、lacZ プロモーターに対し正方向にそう入した。すなわち、pBluescript SK(-)を EcoRV 切断後回収し、Taq DNA polymerase(TAKARA EX Taq、宝酒造社)を加え、dTTP の存在下で、75℃で 2 時間反応させ、プラスミドの 3'端にTを付加した。Tを付加後回収したプラスミドと、PCR後回収した最大のcDNAインサ

ートとを、DNA Ligation Kit(宝酒造社)を用いて、添付の説明書に従って、結合させた。得られた結合反応液を用いて、$CaCl_2$法によって作製した大腸菌 XL-1 Blue 株(Stratagene 社)のコンペテントセルを形質転換し、IPTG、Xgal 及びアンピシリンを含むLB固体培地にまき、37℃で一晩培養した。培養後、インサートの挿入された白色のコロニーをいくつか選択し、アンピシリンを含むLB液体培地中で一晩振とう培養した後、アルカリライシス法によってプラスミドDNAを調製した。得られたプラスミドDNAを制限酵素切断し、cDNAが正方向に挿入されたプラスミドを持つ宿主大腸菌を選抜した。得られたプラスミドを pBNtPX-1(図1)と名付け、選抜した宿主大腸菌は 15%になるようにグリセリンを加え、-80℃で保存した。

pBNtPX-1 を持つ大腸菌をアンピシリンを含むLB液体培地中で一晩培養後、塩化セシウム法によって、プラスミドを大量に精製した。得られたプラスミドを用いて、$CaCl_2$法によって作製した大腸菌 SASX38 株のコンペテントセルを形質転換した。形質転換した SASX38 株をLB培地にまき、28℃で一晩培養した。その結果、pBNtPX-1 を用いた場合には、小さなコロニー中に多数の生育の回復した大きなコロニーが認められた。以上のように、pBNtPX-1 による、大腸菌におけるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性の発現が確認された。

F. DNA塩基配列の解明

上述の大腸菌 SASX38 株の生育を回復させた pBNtPX-1 から、Kilo-Sequence 用 Deletion kit (宝酒造社)を用いて添付の説明書に従ってディリションクローンを作製し、Cycle Sequencing kit AmpliTaq FS(パーキンエルマー社)及びオートシークエンサー(ABI PRISM 310、パーキンエルマー社)を用いて添付の説明書に従って塩基配列を解明した。得られた全塩基配列及びオープンリーディングフレームにおけるアミノ酸配列を、配列表の配列番号1に示した。遺伝子解析ソフト Genetyx(SDC 社)を用いて、塩基配列及びアミノ酸配列を、既知の(WO 95/34659)シロイヌナズナのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのそれらと比較し、相同性を検討した。その結果、pBNtPX-1はシロイヌナズナの葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子と核酸レベルで 69%、アミノ酸レベルで 76%(表5)の高い相同性を示し、タバコの葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子であると考えられた。

また、本ポリペプチドは多くの生物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのN端に保存されているジヌクレオチドバインディングドメイン(GXGXXG)(Nishimura, K. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:8076-8080.)を有していることからもプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼであることが確認された。また、枯草菌及び動物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼでは、このドメインの上流に 8

～11 アミノ酸しか認められないのに対して、タバコの葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼでは 77 アミノ酸が認められ、タバコにおいては、この部分が葉緑体用のトランジットペプチドであると考えられた。

表5 タバコ（上段）及びシロイヌナズナ（下段）の葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのアミノ酸配列の比較

相同性:75.9%

```
1'    MTTTPIANHPNIFTHQSSSSPLAFLNRTSFIPFSSISKRN-SVN-CNGWRTRCSVAKDYT
                           *..*..*.   ..*.**.* ..* ..  * ***** . *
1"                       MELSLLRPTTQSLLPSFSKPNLRLNVYKPLRLRCSVAGGPT

59'   VPSSAVDGGPAAEL--DCVIVGAGISGLCIAQVMSANY----PNLMVTEARDRAGGNITT
      * ** ..** ....  ******.*********......    ***.****.**.****.*
42"   VGSSKIEGGGGTTITTDCVIVGGGISGLCIAQALATKHPDAAPNLIVTEAKDRVGGNIIT

113'  VERDGYLWEEGPNSFQPSDPMLTMAVDCGLKDDLVLGDPNAPRFVLWKGKLRPVPSKLTD
       * .*.******************.**.***********.*******.************
102"  REENGFLWEEGPNSFQPSDPMLTMVVDSGLKDDLVLGDPTAPRFVLWNGKLRPVPSKLTD

173'  LPFFDLMSIPGKLRAGFGAIGLRPSPPGHEESVEQFVRRNLGGEVFERLIEPFCSGVYAG
      ********* **.******.*.******.*****.*******.*****************
162"  LPFFDLMSIGGKIRAGFGALGIRPSPPGREESVEEFVRRNLGDEVFERLIEPFCSGVYAG

233'  DPSKLSMKAAFGKVWKLEETGGSIIGGTFKAIKERSSTPKAPRDPRLPKPKGQTVGSFRK
      ******************..************.**...*** ********.*********
222"  DPSKLSMKAAFGKVWKLEQNGGSIIGGTFKAIQERKNAPKAERDPRLPKPQGQTVGSFRK
```

```
293' GLRMLPDAISARLGSKLKLSWKLSSITKSEKGGYHLTYETPEGVVSLQSRSIVMTVPSYV
     ******.*********.*******.*** *.***.******.*.**.**.*.******.*
282" GLRMLPEAISARLGSKVKLSWKLSGITKLESGGYNLTYETPDGLVSVQSKSVVMTVPSHV

353' ASNILRPLSVAAADALSNFYYPPVGAVTISYPQEAIRDERLVDGELKGFGQLHPRTQGVE
     **..***** .**.***..*****.**.****.****.* *.******************
342" ASGLLRPLSESAANALSKLYYPPVAAVSISYPKEAIRTECLIDGELKGFGQLHPRTQGVE

413' TLGTIYSSSLFPNRAPKGRVLLLNYIGGAKNPEILSKTESQLVEVVDRDLRKMLIKPKAQ
     **************** **.********..*..****.*..***.************..
402" TLGTIYSSSLFPNRAPPGRILLLNYIGGSTNTGILSKSEGELVEAVDRDLRKMLIKPNST

473' DPLVVGVRVWPQAIPQFLVGHLDTLSTAKAAMNDNGLEGLFLGGNYVSGVALGRCVEGAY
     *** .****************.*.*.***......* **********.************
462" DPLKLGVRVWPQAIPQFLVGHFDILDTAKSSLTSSGYEGLFLGGNYVAGVALGRCVEGAY

533' EVASEVTGFLSRYAYK    548
     *.* **..*.******
522" ETAIEVNNFMSRYAYK    537
```

<u>実施例5. 光要求型除草剤耐性タバコカルスのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子</u>

A. PCRによるクローニング

光要求型除草剤耐性カルス ETR-245 株及び感受性カルスからそれぞれSDS／フェノール法によって全RNAを抽出後、mRNA purification kit(ファルマシア社)によって mRNA を精製した。精製した mRNA の 1μg を鋳型とし、Oligo(dT)12-18(ライフテックオリエンタル社)をプライマーとし、SuperscriptTM RNaseH- Reverse Transcriptase(ライフテックオリエンタル社)によって添付の説明書に従って、37℃、1時間の逆転写反応を行った後、フェノール／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によってcDNAを精製した。

得られた cDNA を鋳型とし、PCRによってプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を増幅する

ことを試みた。PCR用のプライマーとしては、フォワードプライマー(5′-GCG GTC TAC AAG TCA GGC AGT CAT-3′、配列番号6)及びリバースプライマー(5′-CAT GCC AAT TTT CCC AAG GCA TGA TCG TAT T-3′、配列番号7)を用い、Taq DNA polymerase(TAKARA EX Taq、宝酒造社)によって、thin wall tube 中で 94℃、3 分間を 1 サイクル、94℃、20 秒間及び 61℃、30 秒間、72℃、1 分 30 秒間を 30 サイクル、72℃5 分間を 1 サイクル行った。得られたPCR反応産物の一部をアガロースゲル電気泳動によって分析したところ、いずれにも 1.7kbp 前後のDNA断片が認められ、これらがプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子断片であると考えられた。そこで、これらDNAを Original TA Cloning KIT(Invitrogene 社)によって、添付の説明書に従って、Tオーバーハングを持ったプラスミドベクターpCRTM2.1 とライゲーションした。ライゲーション産物を用いて、$CaCl_2$ 法によって作製した大腸菌 XL-1 Blue 株(Stratagene 社)のコンペテントセルを形質転換し、IPTG、Xgal 及びアンピシリンを含むLB固体培地にまき、37℃で一晩培養した。培養後、インサートの挿入された白色のコロニーをいくつか選択し、アンピシリンを含むLB液体培地中で一晩振とう培養した後、アルカリライシス法によってプラスミドDNAを調製した。得られたプラスミドDNAを制限酵素切断し、各cDNAが正方向に挿入されたプラスミドを持つ宿主大腸菌を選抜した。感受性株あるいはETR-245株由来の葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子が挿入されたプラスミドを各々pCR-HC あるいは pCR-RC(図2)と名付け、プラスミドを持つ宿主大腸菌は、15%になるようにグリセリンを加え、-80℃で保存した。

これら 2 種のプラスミドを持つ大腸菌をアンピシリンを含むLB液体培地中で一晩培養後、塩化セシウム法によって、プラスミドを大量に精製した。得られたプラスミドを用いて、$CaCl_2$ 法によって作製した大腸菌 SASX38 株のコンペテントセルを形質転換した。形質転換したSASX38 株をLB培地にまき、28℃で一晩培養した。その結果、いずれのプラスミドを用いた場合にも、小さなコロニー中に多数の生育の回復した大きなコロニーが認められた。以上のように、pCR-HC 及び pCR-RC による、大腸菌におけるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性の発現が確認された。

B. 各遺伝子産物の化合物A耐性度の比較

上述の 2 種のプラスミドを含む大腸菌 SASX38 株を、50 μg/ml のアンピシリンを含むLB液体培地で 28℃で終夜振とう培養した。OD_{600} を測定した後、50 μg/ml のアンピシリン及び 0、1、10、100、1,000、2,000、5,000 あるいは 10,000nM の化合物Aを含むLB液体培地に、同一の OD_{600} 値となるように加え、28℃で振とう培養した。経時的に一部を採取し、マイクロプレートリーダー(MTP-120、コロナ電気(株))で OD_{530} を測定し、対照区(化合物A 0nM)の大腸菌の生育を50%になるように阻害する

濃度(IC_{50})を算出した。その結果、pCR-HC あるいは pCR-RC を含む大腸菌では、それぞれIC_{50}は約2.5nM あるいは 10,000nM 以上となり、R/S 比(耐性型のIC_{50}/野生型のIC_{50})は、4,000 以上となった。なお、10,000nM 以上では培地が白濁し、OD_{530} の測定が不可能であった。以上の結果から、ETR-245 株における化合物A耐性機構は、葉緑体型のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子に何らかの変異が生じることによって該酵素が光要求型除草剤耐性型に変異したことであると考えられた。

C. 感受性株及び ETR-245 株由来の葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子の塩基配列の比較

pCR-HC あるいは pCR-RC に含まれる感受性株あるいは ETR-245 株由来の葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子の全塩基配列をそれぞれ、比較することを試みた。タバコ葉由来の遺伝子の塩基配列情報から、プライマーウォーキング用のプライマーを合成し、両遺伝子の全塩基配列を解明した。その結果、pCR-HC の塩基配列はタバコ葉由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子と全く同一の配列であったが、pCR-RC では 1 カ所にのみ変異が認められた。すなわち、配列番号1の717番目の塩基がCからTへと変異し、その結果、配列番号1の231番目のアミノ酸が、アラニンからバリンへと変異していた。pCR-RC にコードされる光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのアミノ酸配列を配列表の配列番号2に、遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号3に示した。タバコとシロイヌナズナのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのアミノ酸配列の相同性は高く(表5)、この変異はWO 95/34659 に記載されたシロイヌナズナのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼにおける 220 番目のアミノ酸であるアラニンのバリンへの変異に伴う光要求型除草剤耐性型への変異(pAraC-1Val)とほぼ同等のものであった。

<u>実施 6. シロイヌナズナの光要求型除草剤耐性型遺伝子</u>

A. シロイヌナズナの葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子のクローニング及び光要求型除草剤耐性型への変換

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* var. Columbia)の葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子のクローニングはタバコの場合と同様に、cDNAライブラリーの作製、大腸菌の hemG 欠損変異株 SASX38 を用いた遺伝的相補法によって行った。得られた遺伝子は pBluescript SK(-)の EcoRV 部位にTAクローニング法によってサブクローニングした。プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子が正方向に挿入され、生物活性を示すプラスミドを pBAtPX-C(図3)と名付けた。

このプラスミドの全塩基配列も既知の塩基配列(WO 95/34659)からデザインしたプライマーを用い、プライマーウォーキングによって既知の配列と同一であることを確認した。

このプラスミドを用い、WO 95/34659に記載された、上述の220番目のアミノ酸であるアラニンのバリンへの変異による光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子(pAraC-1Val)を作出することを試みた。pBAtPX-Cを含む大腸菌XL-1 BlueからヘルパーファージVCS-M13(Stratagene社)を用いて1本鎖DNAを調製した後、kunkel法を利用した部位特異的突然変異用キット(Mutan-K、宝酒造社)を用い、変異導入用オリゴヌクレオチド 5′-GGT GTT TAT GTT GGT GAT CC-3′(配列番号8)によって、光要求型除草剤耐性型に変換した。部位特異的突然変異操作中における非特異的な変異の可能性を排除するために、得られたプラスミド中のcDNAを再度pBluescript SK(-)にサブクローニングし、さらに、cDNAの全塩基配列を解明し、目的とする塩基配列であることを確認した。得られた光要求型除草剤耐性型プラスミドを pBAtPX-RC(図3)と名付けた。

B. シロイヌナズナの野性型及び光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの化合物A耐性度の比較

pBAtPX-C 中のシロイヌナズナの野性型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子の産物と、pBAtPX-RC 中の光要求型除草剤耐性型遺伝子の産物との、化合物A耐性度を比較することを試みた。実施例5Bの各遺伝子産物の化合物A耐性度の比較に記載された方法を用い、それぞれプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの化合物Aに対する IC_{50} を測定した。その結果、野性型では IC_{50} は約5nMであったが、光要求型除草剤耐性型では1,500nMとなり、R/S比(耐性型の IC_{50}／野生型のIC_{50})は約300であった。タバコの場合のR/S比は4,000以上であったため、シロイヌナズナと比較してタバコの方がR/S比が10倍以上高いことがわかった。この違いは、この両者のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのアミノ酸配列の高い相同性を考えた場合、予期せぬ結果であった。

実施例7. 様々な化合物に対する耐性

実施例5B及び実施例 6Bと同様に、タバコの野生型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を含むpCR-HCを保持する大腸菌SASX38株、タバコの耐性型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を含む pCR-RC を保持する大腸菌 SASX38 株、シロイヌナズナの野生型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を含むpBAtPX-Cを保持する大腸菌SASX38株及びシロイヌナズナの耐

性型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を含むpBAtPX-RCを保持する大腸菌SASX38株を用いて、様々なピラゾール系化合物(化合物B、C、D、E、F 及び G)の各大腸菌の生育に対するIC_{50}を測定し、シロイヌナズナの遺伝子における R/S 比(耐性型のIC_{50}/野生型の IC_{50})とタバコの遺伝子における R/S 比を比較した。その結果(表 6)、いずれのピラゾール系化合物に対してもタバコの遺伝子の R/S 比は、シロイヌナズナの遺伝子の R/S 比と比べて、10 倍以上高いことが明らかとなった。この違いは、この両者のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのアミノ酸配列の高い相同性を考えた場合、予期せぬ結果であった。

表 6　化合物A類縁体に対する耐性度(大腸菌液体振とう培養法)

薬剤	I_{50}(nM)						優位性[c]
	シロイヌナズナ			タバコ			
	野生型	耐性型	R/S 比[a]	野生型	耐性型	R/S 比[b]	
化合物B	21	18,000	860	2.2	>20,000	>9,100	>10.6
化合物C	3.0	1,800	600	0.25	2,200	8,800	14.7
化合物D	0.14	280	2,000	0.027	670	25,000	12.5
化合物E	4.2	4,000	950	0.52	6,300	12,000	12.6
化合物F	23	6,400	280	3.2	15,000	4,700	16.8
化合物G	19	8,700	460	3.1	17,000	5,500	12.0

[a, b] 耐性型／野生型

[c] b/a

実施例 8. 形質転換植物体における化合物A耐性度

A. 植物形質転換用ベクターの構築

GUS 遺伝子導入用バイナリーベクターpBI121(Clontech 社)における T-DNA に、タバコ及びシロイヌナズナの野生型及び耐性型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を挿入することを試みた。まず、pBI121 を SacI で切断後、T4DNA ポリメラーゼ(宝酒造社)で平滑末端化した。得られたDNA断片をBamHI で切断した後、アガロースゲル電気泳動によって GUS 遺伝子断片とプラスミド断片に分離し、プラスミド断片を回収した。一方、タバコの野生型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を保持する pCR-HC、タバコの耐性型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を保持する pCR-RC、シロイヌナズナの野生型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を保持する

pBAtPX-C 及びシロイヌナズナの耐性型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を保持するpBAtPX-RC をそれぞれ XhoI で切断後、DNA ポリメラーゼ I の Klenow 断片(宝酒造社)で平滑末端化した。得られた DNA 断片を BamHI で切断した後、アガロースゲル電気泳動によってプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子断片とプラスミド断片に分離し、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子断片を回収した。得られた pBI121 由来のプラスミド断片及び各プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子断片を DNA Ligation Kit(宝酒造社)でライゲーションし、$CaCl_2$ 法で作製した大腸菌 HB101 株のコンペテントセルを形質転換し、カナマイシンを含む LB 固体培地にまき、37℃で一晩培養した。培養後、カナマイシン耐性を示すコロニーをいくつか選択し、カナマイシンを含む LB 液体培地中で一晩振とう培養した後、アルカリライシス法によってプラスミド DNA を調製した。得られたプラスミドDNAを制限酵素切断し、各プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子が挿入されたプラスミドを持つ大腸菌を選抜した。タバコの野生型あるいは耐性型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子が挿入されたバイナリーベクターをそれぞれpBI-NtPX-HCあるいはpBI-NtPX-RC(図4)、シロイヌナズナの野生型あるいは耐性型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子が挿入されたバイナリーベクターをそれぞれ pBI-AtPX-HC あるいは pBI-AtPX-RC(図5)と名付け、プラスミドを持つ大腸菌は 15%になるようにグリセリンを加え、-80℃で保存した。

B. Agrobacterium tumefaciens への植物形質転換用ベクターの導入

上述の 4 種のバイナリーベクターを Triparental mating 法によって Agrobacterium tumefaciens LBA4404 株(Clontech 社)に導入した。すなわち、バイナリーベクターを保持する大腸菌 HB101 株、ヘルパーファージ pRK2013 を保持する大腸菌 HB101 株(Clontech 社)及び A. tumefaciens LBA4404 株を NB 寒天培地(0.8% Nutrient broth、1.5% 細菌培地用寒天(和光純薬社))で 28℃、2 日間培養した後、3 者をよく混和し、28℃でさらに 2 日間培養した。混和した菌体をカナマイシンとストレプトマイシンを含む AB 寒天培地(0.3% K_2HPO_4、0.1% NaH_2PO_4、0.1% NH_4Cl、0.03% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、0.015% KCl、0.015% $CaCl_2$、0.00025% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、0.5% グルコース、1.5% 細菌培地用寒天)にストリークした。28℃で、4 日間培養後、シングルコロニーをかきとり、カナマイシンとストレプトマイシンを含む AB 液体培地で 28℃、2 日間培養し、アルカリライシス法によってプラスミドの確認を行った。バイナリーベクターを保持する A. tumefaciens LBA4404 株は、15%になるようにグリセリンを加え、-80℃で保存した。

C. A. tumefaciens による形質転換植物の作出

-80℃で保存しているバイナリーベクターを保持する A. tumefaciens を、カナマイシンを含む 523

液体培地(1% シュクロース、0.8% Bacto-tryptone、0.4% Bacto-yeast extract、0.2% K_2HPO_4、0.03% $MgSO_4\cdot 7H_2O$)で 27℃、24 時間振とう培養した。表面殺菌したタバコ(N. tabacum var. SR1)のリーフディスク(直径 9mm)を A. tumefaciens の振とう培養液に 1 分間浸漬後、滅菌ペーパータオルで付着した培養液を拭き取った。リーフディスクを 2ppm の NAA 及び 0.2ppm の BA を添加した 0.6%寒天を含む MS 固体培地に葉の裏を上にして静置し、25℃で 48 時間培養した。リーフディスクを 500ppm のカルベニシリンと 200ppm のクラフォランを含む、2ppm の NAA 及び 0.2ppm の BA を添加した MS 液体培地に移し、27℃で 48～72 時間振とう培養し、A. tumefaciens を除去した。リーフディスクを 100ppm のカルベニシリン、200ppm のクラフォラン及び 150ppm のカナマイシンを含む、0.1ppm の NAA 及び 4ppm の BA を添加した 0.6%寒天を含む MS 固体培地に移し、27℃で 2～3 週間培養し、シュートの形成を誘導した。シュートは発根培地(1/2 MS、0.02ppm IBA、1.5% シュクロース、0.2% ジェランガム)に移植し、発根を誘導した。得られた幼植物は培養土に移植し、温室内で生育させた。

D. 形質転換植物における導入遺伝子の確認

PCR 法によって形質転換植物中の導入遺伝子を確認することを試みた。すなわち、形質転換植物の葉から CTAB 法によってゲノム DNA を抽出、精製した。得られたゲノム DNA を鋳型として、Taq DNA polymerase(TAKARA EX Taq、宝酒造社)、CaMV 35S プロモーター用フォワードプライマー(5'-CAC AGA TGG TTA GAG AGG CTT ACG CAG-3'、配列番号 9)、NOS ターミネーター用リバースプライマー(5'-TCA TCG CAA GAC CGG CAA CAG GAT TCA-3'、配列番号 10)を用い、thin wall tube 中で 94℃、3 分間を 1 サイクル、94℃、20 秒間、62℃、30 秒間及び 72℃、3 分間を 30 サイクル行った。得られた反応産物の一部をアガロース電気泳動によって分析したところ、80%以上の植物体に 2.7kb 前後の DNA 断片が認められた。

E. 化合物A耐性度の検定

導入遺伝子の確認を終了した形質転換植物体及び対照の非形質転換植物体から、ほぼ同じ葉位の葉を採取し、直径 9mm のリーフディスクを調製し、0、125、250、500、1,250、2,500、5,000、12,500nM の化合物A水溶液を含むシャーレに浮かべた。27℃、連続強光下で一週間培養後、リーフディスクの白化度を観察し、化合物A許容濃度を算出した。その結果(表 7)、pBI-NtPX-RC によってタバコの耐性型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を導入した場合は、対照の非形質転換植物と比較して、100 倍以上の耐性度を示したが、pBI-AtPX-RC によってシロイヌナズナの耐性型遺伝子を導入した場合には、対照と比較して 4 倍の耐性を示し、感受性型遺伝子を導入した場合には、いずれもそれほど強い耐性は認められなかった。したがって、植物体で光要求型除草

剤耐性を発現させるためには、本発明のタバコの耐性型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子が有用であることが明らかとなった。

表 7　形質転換タバコ植物体レベルにおける化合物Aに対する耐性度（リーフディスク法）

導入遺伝子（ベクター）	化合物A許容濃度	耐性度
なし	125nM	×1
シロイヌナズナ野生型(pBI-AtPX-HC)	250nM	×2
シロイヌナズナ耐性型(pBI-AtPX-RC)	500nM	×4
タバコ野生型(pBI-NtPX-HC)	500nM	×4
タバコ耐性型(pBI-NtPX-RC)	>12,500nM	>×100

本発明者は、前記課題を解決すべく、高等植物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼについて鋭意研究を行った結果、タバコ由来の、光要求型除草剤に耐性を示すプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの遺伝子のクローニング及び発現に成功した。本遺伝子産物の光要求型除草剤に対する耐性度を、既に報告されているシロイヌナズナ由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの耐性度と比較したところ、両者の構造の高い類似性にもかかわらず、本遺伝子産物の耐性度が大いに勝っていることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

植物由来の新規且つ光要求型除草剤に高度に耐性なプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを得た結果、該酵素を宿主植物中で発現させることによって、光要求型除草剤に高度に耐性な植物を作出することが可能である。

請求の範囲

1. 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、又は該アミノ酸配列において1個または複数個のアミノ酸の欠失、付加あるいは置換等が認められるアミノ酸配列を有し且つ実質的にプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼと同等の酵素活性を有する変異ペプチドからなる光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、その誘導体。

2. 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1個または複数個のアミノ酸が欠失し且つ実質的に同等の酵素活性を有する光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、その誘導体。

3. 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、又は該アミノ酸配列において、トランジットペプチドが欠失し、さらに1個または複数個のアミノ酸の欠失、付加あるいは置換等が認められるアミノ酸配列を有し且つ実質的に同等の酵素活性を有する変異ペプチドからなる光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、その誘導体。

4. 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、トランジットペプチドが欠失し且つ実質的に同等の酵素活性を有する光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ。

5. 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ。

6. 光要求型除草剤がピラゾール系化合物である請求項1乃至5のいずれかに記載の光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ。

7. 光要求型除草剤が2-クロロ-5-(4-クロロ-5-ジフルオロメトキシ-1-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-4-フルオロフェノキシ酢酸エチル、2-[5-(4-クロロ-5-ジフルオロメトキシ-1-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-2, 4-ジクロロ-フェニルアミノ] プロピオン酸エチル、4-クロロ-3-(4-クロロ-2-フルオロ-5-メトキシフェニル)-5-ジフルオロメトキシ-1-メチル-1H-ピラゾール、4-クロロ-3-[4-クロロ-2-フルオロ-5-(2-プロピニル)オキシフェニル]-5- ジフルオロメトキシ-1-メチル-1H-ピラゾール、2-[2-クロロ-5-(4-クロロ-5-ジフルオロメトキシ-1-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-4-フルオロフェノキシ]プロピオン酸エチル、5-[4-ブロモ-1-メチル-5-(トリフルオロメチル)-1H-ピラゾール-3-イル]-2-クロロ-4-フルオロ-安息香酸 1-メチルエチル及び 4-クロロ-3-(4-クロロ-2-フルオロフェニル)-5-ジフルオロメトキシ-1-メチル-1H-ピラゾールからなる群から選ばれたピラゾール系化合物である請求項1乃至5のいずれかに記載の光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ。

8. 光要求型除草剤が 2-クロロ-5-(4-クロロ-5-ジフルオロメトキシ-1-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-4-フルオロフェノキシ酢酸エチルである請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ。

9. 請求項1に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子。

10. 請求項2に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子。

11. 請求項3に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子。

12. 請求項4に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子。

13. 請求項5に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子。

14. 配列番号3に記載の塩基配列を有する遺伝子。

15. 請求項 9 に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

16. 請求項 10 に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

17. 請求項 11 に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

18. 請求項 12 に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

19. 請求項13 に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

20. 請求項14 に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

21. 請求項15 に記載のベクターによる形質転換体。

22. 請求項16 に記載のベクターによる形質転換体。

23. 請求項17 に記載のベクターによる形質転換体。

24. 請求項18 に記載のベクターによる形質転換体。

25. 請求項19 に記載のベクターによる形質転換体。

26. 請求項 20 に記載のベクターによる形質転換体。

第１図

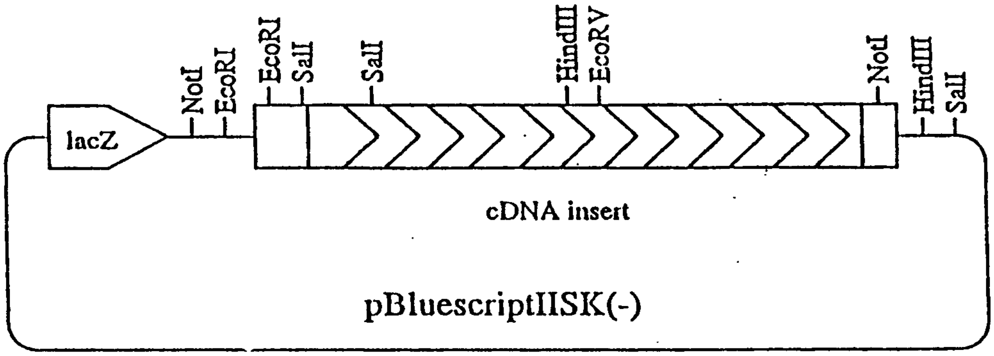

図1　pBNtPX-1の模式図

第２図

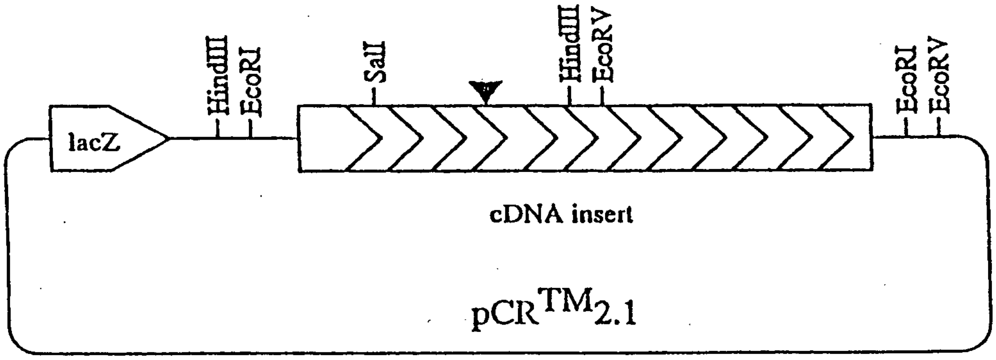

図２　pCR-HC及びpCR-RCの模式図

第３図

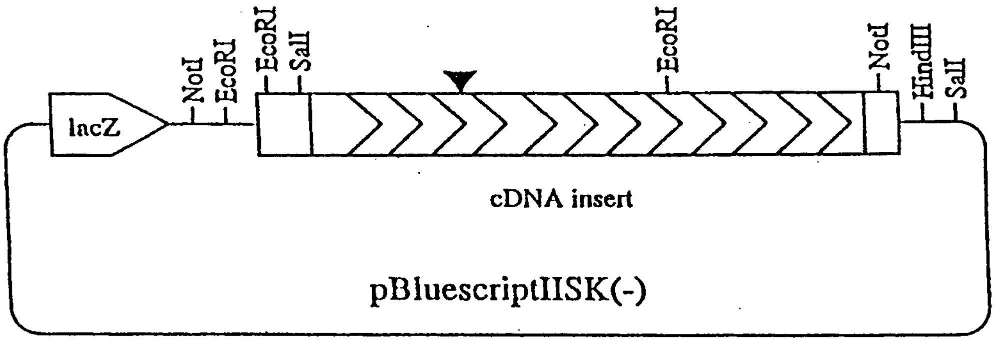

図３　pBAtPX-C及びpBAtPX-RCの模式図

第４図

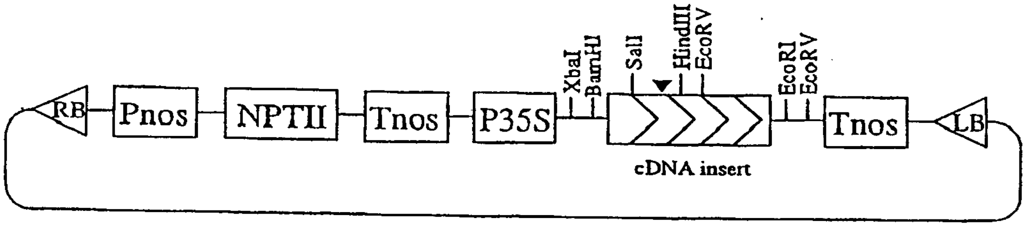

図4　pBI-NtPX-HC及びpBI-NtPX-RCの模式図

第５図

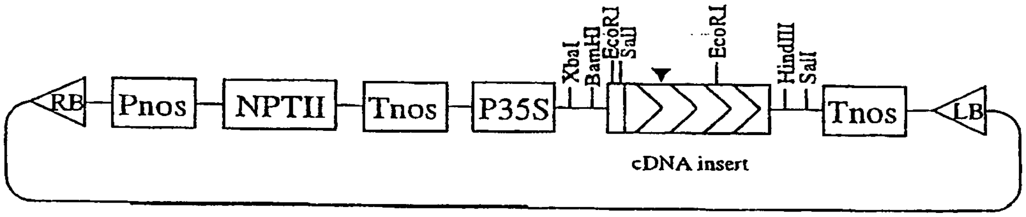

図5　pBI-AtPX-HC及びpBI-AtPX-RCの模式図

［配列表］

配列表 1

配列番号：1

配列の長さ：1874

配列の形：核酸

トポロジー：直鎖状

鎖の数：二本鎖

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：タバコ(Nicotiana tabacum)

株名：SR1

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：26..1672

特徴を決定した方法：P

```
AGCGCGGTCT ACAAGTCAGG CAGTC ATG ACA ACA ACT CCC ATC GCC AAT CAT      52
                            Met Thr Thr Thr Pro Ile Ala Asn His
                             1               5

CCT AAT ATT TTC ACT CAC CAG TCG TCG TCA TCG CCA TTG GCA TTC TTA     100
Pro Asn Ile Phe Thr His Gln Ser Ser Ser Ser Pro Leu Ala Phe Leu
 10                  15                  20                  25

AAC CGT ACG AGT TTC ATC CCT TTC TCT TCA ATC TCC AAG CGC AAT AGT     148
Asn Arg Thr Ser Phe Ile Pro Phe Ser Ser Ile Ser Lys Arg Asn Ser
                 30                  35                  40
```

GTC AAT TGC AAT GGC TGG AGA ACA CGA TGC TCC GTT GCC AAA GAT TAC 196
Val Asn Cys Asn Gly Trp Arg Thr Arg Cys Ser Val Ala Lys Asp Tyr
45 50 55

ACA GTT CCT TCC TCA GCG GTC GAC GGC GGA CCC GCC GCG GAG CTG GAC 244
Thr Val Pro Ser Ser Ala Val Asp Gly Gly Pro Ala Ala Glu Leu Asp
60 65 70

TGT GTT ATA GTT GGA GCA GGA ATT AGT GGC CTC TGC ATT GCG CAG GTG 292
Cys Val Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Val
75 80 85

ATG TCC GCT AAT TAC CCC AAT TTG ATG GTA ACC GAG GCG AGA GAT CGT 340
Met Ser Ala Asn Tyr Pro Asn Leu Met Val Thr Glu Ala Arg Asp Arg
90 95 100 105

GCC GGT GGC AAC ATA ACG ACT GTG GAA AGA GAC GGC TAT TTG TGG GAA 388
Ala Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Asp Gly Tyr Leu Trp Glu
110 115 120

GAA GGT CCC AAC AGT TTC CAG CCG TCC GAT CCT ATG TTG ACT ATG GCA 436
Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Ala
125 130 135

GTA GAT TGT GGA TTG AAG GAT GAT TTG GTG TTG GGA GAT CCT AAT GCG 484
Val Asp Cys Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Asn Ala
140 145 150

CCC CGT TTC GTT TTG TGG AAG GGT AAA TTA AGG CCC GTC CCC TCA AAA 532

Pro Arg Phe Val Leu Trp Lys Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys
155 160 165

CTC ACT GAT CTT CCC TTT TTT GAT TTG ATG AGC ATT CCT GGC AAG TTG 580
Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Pro Gly Lys Leu
170 175 180 185

AGA GCT GGT TTT GGT GCC ATT GGC CTC CGC CCT TCA CCT CCA GGT CAT 628
Arg Ala Gly Phe Gly Ala Ile Gly Leu Arg Pro Ser Pro Pro Gly His
190 195 200

GAG GAA TCA GTT GAG CAG TTC GTG CGT CGT AAT CTT GGT GGC GAA GTC 676
Glu Glu Ser Val Glu Gln Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Gly Glu Val
205 210 215

TTT GAA CGC TTG ATA GAA CCA TTT TGT TCT GGT GTT TAT GCT GGT GAT 724
Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp
220 225 230

CCC TCA AAA CTG AGT ATG AAA GCA GCA TTT GGG AAA GTT TGG AAG TTG 772
Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu
235 240 245

GAA GAA ACT GGT GGT AGC ATT ATT GGA GGA ACC TTT AAA GCA ATA AAG 820
Glu Glu Thr Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Lys
250 255 260 265

GAG AGA TCC AGT ACA CCT AAA GCG CCC CGC GAT CCG CGT TTA CCT AAA 868
Glu Arg Ser Ser Thr Pro Lys Ala Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys

270 275 280

CCA AAA GGA CAG ACA GTT GGA TCA TTC AGG AAG GGT CTC AGA ATG CTG 916

Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu

285 290 295

CCG GAT GCA ATC AGT GCA AGA TTG GGA AGC AAA TTA AAA CTA TCA TGG 964

Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Lys Leu Lys Leu Ser Trp

300 305 310

AAG CTT TCT AGC ATT ACT AAG TCA GAA AAA GGA GGA TAT CAC TTG ACA 1012

Lys Leu Ser Ser Ile Thr Lys Ser Glu Lys Gly Gly Tyr His Leu Thr

315 320 325

TAC GAG ACA CCA GAA GGA GTA GTT TCT CTT CAA AGT CGA AGC ATT GTC 1060

Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Leu Gln Ser Arg Ser Ile Val

330 335 340 345

ATG ACT GTG CCA TCC TAT GTA GCA AGC AAC ATA TTA CGT CCT CTT TCG 1108

Met Thr Val Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asn Ile Leu Arg Pro Leu Ser

350 355 360

GTT GCC GCA GCA GAT GCA CTT TCA AAT TTC TAC TAT CCC CCA GTT GGA 1156

Val Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Asn Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Gly

365 370 375

GCA GTC ACA ATT TCA TAT CCT CAA GAA GCT ATT CGT GAT GAG CGT CTG 1204

Ala Val Thr Ile Ser Tyr Pro Gln Glu Ala Ile Arg Asp Glu Arg Leu

380 385 390

GTT GAT GGT GAA CTA AAG GGA TTT GGG CAG TTG CAT CCA CGT ACA CAG 1252
Val Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln
395 400 405

GGA GTG GAA ACA CTA GGA ACG ATA TAT AGT TCA TCA CTC TTC CCT AAC 1300
Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn
410 415 420 425

CGT GCC CCA AAA GGT CGG GTG CTA CTC TTG AAC TAC ATT GGA GGA GCA 1348
Arg Ala Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala
430 435 440

AAA AAT CCT GAA ATT TTG TCT AAG ACG GAG AGC CAA CTT GTG GAA GTA 1396
Lys Asn Pro Glu Ile Leu Ser Lys Thr Glu Ser Gln Leu Val Glu Val
445 450 455

GTT GAT CGT GAC CTC AGA AAA ATG CTT ATA AAA CCC AAA GCT CAA GAT 1444
Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Lys Ala Gln Asp
460 465 470

CCT CTT GTT GTG GGT GTG CGA GTA TGG CCA CAA GCT ATC CCA CAG TTT 1492
Pro Leu Val Val Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe
475 480 485

TTG GTT GGT CAT CTG GAT ACG CTA AGT ACT GCA AAA GCT GCT ATG AAT 1540
Leu Val Gly His Leu Asp Thr Leu Ser Thr Ala Lys Ala Ala Met Asn
490 495 500 505

GAT AAT GGG CTT GAA GGG CTG TTT CTT GGG GGT AAT TAT GTG TCA GGT 1588

Asp Asn Gly Leu Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly

510 515 520

GTA GCA TTG GGG AGG TGT GTT GAA GGT GCT TAT GAA GTT GCA TCC GAG 1636

Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Val Ala Ser Glu

525 530 535

GTA ACA GGA TTT CTG TCT CGG TAT GCA TAC AAA TGAAACCTGT GTTGGGGGTA 1689

Val Thr Gly Phe Leu Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys

540 545

GTCCAAACCT TGTTAGTAGT ACGATCATGC CTTGGGAAAA TTGGCATGTG CCTAAAAGTT 1749

TTGCTCATTA GAGTTATTTT AGCCTTGGTA AATGATTTGT ACTTGATATC AGTCGTTTTC 1809

TTTGAGATAA AATGTTCCTG TTCAGGAAAT ATAATGTATA TCAATTTTAA ACAAAAAAAA 1869

AAAAA 1874

配列表 2

配列番号:2

配列の長さ:548

配列の形:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

起源:

生物名:タバコ(Nicotiana tabacum)

株名:Xanthi NC

Met Thr Thr Thr Pro Ile Ala Asn His Pro Asn Ile Phe Thr His Gln
1 5 10 15

Ser Ser Ser Ser Pro Leu Ala Phe Leu Asn Arg Thr Ser Phe Ile Pro
20 25 30

Phe Ser Ser Ile Ser Lys Arg Asn Ser Val Asn Cys Asn Gly Trp Arg
35 40 45

Thr Arg Cys Ser Val Ala Lys Asp Tyr Thr Val Pro Ser Ser Ala Val
50 55 60

Asp Gly Gly Pro Ala Ala Glu Leu Asp Cys Val Ile Val Gly Ala Gly
65 70 75 80

Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Val Met Ser Ala Asn Tyr Pro Asn
85 90 95

Leu Met Val Thr Glu Ala Arg Asp Arg Ala Gly Gly Asn Ile Thr Thr

100 105 110

Val Glu Arg Asp Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln

115 120 125

Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Ala Val Asp Cys Gly Leu Lys Asp

130 135 140

Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Lys

145 150 155 160

Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe

165 170 175

Asp Leu Met Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly Phe Gly Ala Ile

180 185 190

Gly Leu Arg Pro Ser Pro Pro Gly His Glu Glu Ser Val Glu Gln Phe

195 200 205

Val Arg Arg Asn Leu Gly Gly Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro

210 215 220

Phe Cys Ser Gly Val Tyr Val Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys

225 230 235 240

Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Glu Thr Gly Gly Ser Ile

245 250 255

Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Lys Glu Arg Ser Ser Thr Pro Lys
260 265 270

Ala Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly
275 280 285

Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg
290 295 300

Leu Gly Ser Lys Leu Lys Leu Ser Trp Lys Leu Ser Ser Ile Thr Lys
305 310 315 320

Ser Glu Lys Gly Gly Tyr His Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val
325 330 335

Val Ser Leu Gln Ser Arg Ser Ile Val Met Thr Val Pro Ser Tyr Val
340 345 350

Ala Ser Asn Ile Leu Arg Pro Leu Ser Val Ala Ala Ala Asp Ala Leu
355 360 365

Ser Asn Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Gly Ala Val Thr Ile Ser Tyr Pro
370 375 380

Gln Glu Ala Ile Arg Asp Glu Arg Leu Val Asp Gly Glu Leu Lys Gly
385 390 395 400

Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr
405 410 415

Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Lys Gly Arg Val
420 425 430

Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Lys Asn Pro Glu Ile Leu Ser
435 440 445

Lys Thr Glu Ser Gln Leu Val Glu Val Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys
450 455 460

Met Leu Ile Lys Pro Lys Ala Gln Asp Pro Leu Val Val Gly Val Arg
465 470 475 480

Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Thr
485 490 495

Leu Ser Thr Ala Lys Ala Ala Met Asn Asp Asn Gly Leu Glu Gly Leu
500 505 510

Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val
515 520 525

Glu Gly Ala Tyr Glu Val Ala Ser Glu Val Thr Gly Phe Leu Ser Arg
530 535 540

Tyr Ala Tyr Lys
545

配列表 3

配列番号:3

配列の長さ:1874

配列の形:核酸

トポロジー:直鎖状

鎖の数:二本鎖

配列の種類:cDNA to mRNA

起源

生物名:タバコ(Nicotiana tabacum)

株名:Xanthi NC

配列の特徴

特徴を表す記号:CDS

存在位置:26..1672

特徴を決定した方法:P

```
AGCGCGGTCT ACAAGTCAGG CAGTC ATG ACA ACA ACT CCC ATC GCC AAT CAT     52
                            Met Thr Thr Thr Pro Ile Ala Asn His
                              1               5

CCT AAT ATT TTC ACT CAC CAG TCG TCG TCA TCG CCA TTG GCA TTC TTA    100
Pro Asn Ile Phe Thr His Gln Ser Ser Ser Ser Pro Leu Ala Phe Leu
 10                  15                  20                  25

AAC CGT ACG AGT TTC ATC CCT TTC TCT TCA ATC TCC AAG CGC AAT AGT    148
Asn Arg Thr Ser Phe Ile Pro Phe Ser Ser Ile Ser Lys Arg Asn Ser
                 30                  35                  40

GTC AAT TGC AAT GGC TGG AGA ACA CGA TGC TCC GTT GCC AAA GAT TAC    196
```

Val Asn Cys Asn Gly Trp Arg Thr Arg Cys Ser Val Ala Lys Asp Tyr

45 50 55

ACA GTT CCT TCC TCA GCG GTC GAC GGC GGA CCC GCC GCG GAG CTG GAC 244

Thr Val Pro Ser Ser Ala Val Asp Gly Gly Pro Ala Ala Glu Leu Asp

60 65 70

TGT GTT ATA GTT GGA GCA GGA ATT AGT GGC CTC TGC ATT GCG CAG GTG 292

Cys Val Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Val

75 80 85

ATG TCC GCT AAT TAC CCC AAT TTG ATG GTA ACC GAG GCG AGA GAT CGT 340

Met Ser Ala Asn Tyr Pro Asn Leu Met Val Thr Glu Ala Arg Asp Arg

90 95 100 105

GCC GGT GGC AAC ATA ACG ACT GTG GAA AGA GAC GGC TAT TTG TGG GAA 388

Ala Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Asp Gly Tyr Leu Trp Glu

110 115 120

GAA GGT CCC AAC AGT TTC CAG CCG TCC GAT CCT ATG TTG ACT ATG GCA 436

Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Ala

125 130 135

GTA GAT TGT GGA TTG AAG GAT GAT TTG GTG TTG GGA GAT CCT AAT GCG 484

Val Asp Cys Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Asn Ala

140 145 150

CCC CGT TTC GTT TTG TGG AAG GGT AAA TTA AGG CCC GTC CCC TCA AAA 532

Pro Arg Phe Val Leu Trp Lys Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys

155 160 165

CTC ACT GAT CTT CCC TTT TTT GAT TTG ATG AGC ATT CCT GGC AAG TTG 580
Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Pro Gly Lys Leu
170 175 180 185

AGA GCT GGT TTT GGT GCC ATT GGC CTC CGC CCT TCA CCT CCA GGT CAT 628
Arg Ala Gly Phe Gly Ala Ile Gly Leu Arg Pro Ser Pro Pro Gly His
190 195 200

GAG GAA TCA GTT GAG CAG TTC GTG CGT CGT AAT CTT GGT GGC GAA GTC 676
Glu Glu Ser Val Glu Gln Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Gly Glu Val
205 210 215

TTT GAA CGC TTG ATA GAA CCA TTT TGT TCT GGT GTT TAT GTT GGT GAT 724
Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Val Gly Asp
220 225 230

CCC TCA AAA CTG AGT ATG AAA GCA GCA TTT GGG AAA GTT TGG AAG TTG 772
Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu
235 240 245

GAA GAA ACT GGT GGT AGC ATT ATT GGA GGA ACC TTT AAA GCA ATA AAG 820
Glu Glu Thr Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Lys
250 255 260 265

GAG AGA TCC AGT ACA CCT AAA GCG CCC CGC GAT CCG CGT TTA CCT AAA 868
Glu Arg Ser Ser Thr Pro Lys Ala Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys
270 275 280

CCA AAA GGA CAG ACA GTT GGA TCA TTC AGG AAG GGT CTC AGA ATG CTG 916
Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu
285 290 295

CCG GAT GCA ATC AGT GCA AGA TTG GGA AGC AAA TTA AAA CTA TCA TGG 964
Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Lys Leu Lys Leu Ser Trp
300 305 310

AAG CTT TCT AGC ATT ACT AAG TCA GAA AAA GGA GGA TAT CAC TTG ACA 1012
Lys Leu Ser Ser Ile Thr Lys Ser Glu Lys Gly Gly Tyr His Leu Thr
315 320 325

TAC GAG ACA CCA GAA GGA GTA GTT TCT CTT CAA AGT CGA AGC ATT GTC 1060
Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Leu Gln Ser Arg Ser Ile Val
330 335 340 345

ATG ACT GTG CCA TCC TAT GTA GCA AGC AAC ATA TTA CGT CCT CTT TCG 1108
Met Thr Val Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asn Ile Leu Arg Pro Leu Ser
350 355 360

GTT GCC GCA GCA GAT GCA CTT TCA AAT TTC TAC TAT CCC CCA GTT GGA 1156
Val Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Asn Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Gly
365 370 375

GCA GTC ACA ATT TCA TAT CCT CAA GAA GCT ATT CGT GAT GAG CGT CTG 1204
Ala Val Thr Ile Ser Tyr Pro Gln Glu Ala Ile Arg Asp Glu Arg Leu
380 385 390

GTT GAT GGT GAA CTA AAG GGA TTT GGG CAG TTG CAT CCA CGT ACA CAG 1252

Val Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln
395 400 405

GGA GTG GAA ACA CTA GGA ACG ATA TAT AGT TCA TCA CTC TTC CCT AAC 1300
Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn
410 415 420 425

CGT GCC CCA AAA GGT CGG GTG CTA CTC TTG AAC TAC ATT GGA GGA GCA 1348
Arg Ala Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala
430 435 440

AAA AAT CCT GAA ATT TTG TCT AAG ACG GAG AGC CAA CTT GTG GAA GTA 1396
Lys Asn Pro Glu Ile Leu Ser Lys Thr Glu Ser Gln Leu Val Glu Val
445 450 455

GTT GAT CGT GAC CTC AGA AAA ATG CTT ATA AAA CCC AAA GCT CAA GAT 1444
Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Lys Ala Gln Asp
460 465 470

CCT CTT GTT GTG GGT GTG CGA GTA TGG CCA CAA GCT ATC CCA CAG TTT 1492
Pro Leu Val Val Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe
475 480 485

TTG GTT GGT CAT CTG GAT ACG CTA AGT ACT GCA AAA GCT GCT ATG AAT 1540
Leu Val Gly His Leu Asp Thr Leu Ser Thr Ala Lys Ala Ala Met Asn
490 495 500 505

GAT AAT GGG CTT GAA GGG CTG TTT CTT GGG GGT AAT TAT GTG TCA GGT 1588
Asp Asn Gly Leu Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly

510 515 520

GTA GCA TTG GGG AGG TGT GTT GAA GGT GCT TAT GAA GTT GCA TCC GAG 1636
Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Val Ala Ser Glu
525 530 535

GTA ACA GGA TTT CTG TCT CGG TAT GCA TAC AAA TGAAACCTGT GTTGGGGGTA 1689
Val Thr Gly Phe Leu Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys
540 545

GTCCAAACCT TGTTAGTAGT ACGATCATGC CTTGGGAAAA TTGGCATGTG CCTAAAAGTT 1749
TTGCTCATTA GAGTTATTTT AGCCTTGGTA AATGATTTGT ACTTGATATC AGTCGTTTTC 1809
TTTGAGATAA AATGTTCCTG TTCAGGAAAT ATAATGTATA TCAATTTTAA ACAAAAAAAA 1869
AAAAA 1874

配列表 4

配列番号:4

配列の長さ:23

配列の形:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸　合成オリゴヌクレオチド

ATTGGTGGCG ACGACTCCTG GAG

配列表 5

配列番号:5

配列の長さ:24

配列の形:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸　合成オリゴヌクレオチド

CCAGACCAAC TGGTAATGGT AGCG

配列表 6

配列番号:6

配列の長さ:24

配列の形:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸　合成オリゴヌクレオチド

GCGGTCTACA AGTCAGGCAG TCAT

配列表 7

配列番号:7

配列の長さ:31

配列の形:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸　合成オリゴヌクレオチド

CATGCCAATT TTCCCAAGGC ATGATCGTAC T

配列表 8

配列番号:8

配列の長さ:20

配列の形:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸　合成オリゴヌクレオチド

GGTGTTTATG TTGGTGATCC

配列表9

配列番号:9

配列の長さ:27

配列の形:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸　合成オリゴヌクレオチド

CACAGATGGT TAGAGAGGCT TACGCAG

配列表10

配列番号:10

配列の長さ:27

配列の形:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸　合成オリゴヌクレオチド

TCATCGCAAG ACCGGCAACA GGATTCA

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/04064

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/53, C12N9/02, C12N1/21, A01H5/00 // (C12N1/21, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12N15/53, C12N9/02, C12N1/21, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 94, No. 16, (1997), Inna Lermontova et al., "Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase" p.8895-8900	1-26
Y	Biochem. J., vol. 260, (1989), Michel Matringe et al., "Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target for diphenyl ether herbicides" p.231-235	1-26
Y	The Journal of Biological Chemistry, vol. 270, No. 14, (1995), Koichi Nishimura et al., "Cloning of a Human cDNA for Protoporphyrinogen Oxidase by Complementation in Vivo of a hemG Mutant of Escherichia coli" p.8076-8080	1-26
Y	Journal of General Microbiology, vol. 113, (1979), A. Sasarman, P. et al., "Mapping of a New hem Gene in Escherichia coli K12" p.297-303	1-26

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 15 December, 1998 (15. 12. 98)	Date of mailing of the international search report 22 December, 1998 (22. 12. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/04064

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Gene, vol. 182, No.1-2, (1996), Shin-ichiro Narita et al., "Molecular cloning and characterization of a cDNA that encodes protoporphyrinogen oxidase of Arabidopsis thaliana" p.169-175	1-26
Y	WO, 95/34659, A (Novartis AG.), 21 December, 1995 (21. 12. 95) & JP, 10-502524, A	1-26

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ９８／０４０６４

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））
Int.Cl⁶ Ｃ１２Ｎ　１５／５３，Ｃ１２Ｎ　９／０２，Ｃ１２Ｎ　１／２１，Ａ０１Ｈ　５／００//(Ｃ１２Ｎ　１／２１，Ｃ１２Ｒ　１：１９)

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））
Int.Cl⁶ Ｃ１２Ｎ　１５／５３，Ｃ１２Ｎ　９／０２，Ｃ１２Ｎ　１／２１，Ａ０１Ｈ　５／００

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
MEDLINE(STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 94, No. 16, (1997), Inna Lermontova et al. "Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase" p. 8895-8900	１－２６
Y	Biochem. J., vol. 260, (1989), Michel Matringe at al. "Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target for diphenyl ether herbicides" p. 231-235	１－２６

☒ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 １５．１２．９８	国際調査報告の発送日　22.12.98
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　９３５９ 光本　美奈子　印 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４９

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	The Journal of Biological Chemistry, vol.270, No.14, (1995), Koichi Nishimura et al. "Cloning of a Human cDNA for Protoporphyrinogen Oxidase by Complementation in Vivo of a hemG Mutant of Escherichia coli" p.8076-8080	１－２６
Y	Journal of General Microbiology, vol.113, (1979), A.Sasarman,P.et al. "Mapping of a New hem Gene in Escherichia coli K12" p.297-303	１－２６
A	Gene, vol.182, No.1-2, (1996), Shin-ichiro Narita et al. "Molecular cloning and characterization of a cDNA that encodes protoporphyrinogen oxidase of Arabidopsis thaliana" p.169-175	１－２６
Y	WO,95/34659,A（ノバルティス　アクチエンゲゼルシャフト） 21.12月.1995 (21.12.95) & JP,10-502524,A	１－２６